

**Untersuchung an Pilzinhaltsstoffen
Der Schleim des Hexeneies,
Phallus impudicus L.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans Jürgen Bindler
aus Chemnitz

Marburg 1967

**Untersuchung an Pilzinhaltsstoffen
Der Schleim des Hexeneies,
Phallus impudicus L.**



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans Jürgen Bindler

aus Chemnitz

Marburg 1967



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 21.10.1967
Tag der mündlichen Prüfung: 1.11.1967
Berichterstatter: Prof. Dr. P. H. List
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Böhme

I. Allgemeiner Teil	
A. Einführung und Begründung	1
B. Die Werte (Moralische, ästhetische, soziale)	15
1. Ethik	16
2. Ästhetik und Kunsttheorie	18
3. Pädagogik	20
C. Methode und Darstellung	22
D. Bedeutung und Einwirkung der Kulturwissenschaften	25
E. Zusammenfassung (Einführung des Lesers in die Kulturwissenschaften)	27
II. Besondere Teil	
A. Einführung in die Kultur der Gegenwart	30
1. Kulturwissenschaftliche Methode	31
2. Kulturwissenschaftliche Methode	33
3. Kulturwissenschaftliche Methode	35
B. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	37
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	38
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	40
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	42
C. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	44
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	45
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	47
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	49
D. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	51
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	52
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	54
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	56
E. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	58
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	59
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	61
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	63
F. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	65
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	66
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	68
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	70
G. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	72
1. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	73
2. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	75
3. Kulturwissenschaftliche Methode der Kulturwissenschaften	77

Inhalt

	Seite
I. Allgemeiner Teil	
A. Einleitung und Problemstellung	9
B. Die Natur pflanzlicher Polysaccharide	13
1. Stärke	14
2. Cellulose und Hemicellulosen	15
3. Polyuronide	16
4. Gummis und Schleime	17
C. Gewinnung und Reinigung des Hexeneischleimes	20
D. Rheologische Untersuchung des Hexeneischleimes	25
E. Untersuchung der Einheitlichkeit von Polysacchariden	34
1. Methoden zum Beweis der Einheitlichkeit	35
a. Einheitlichkeitsnachweis mittels Ultrazentrifuge	36
b. Einheitlichkeitsnachweis mittels Elektrophorese	37
2. Untersuchung der Einheitlichkeit des Hexeneischleimes mittels Elektrophorese	39
F. Fraktionierung von Polysacchariden	41
1. Fraktionierungsmethoden	41
2. Fraktionierung des Hexeneischleimes an DEAE-Cellulose	46
G. Qualitative Bausteinanalyse der Schleimfraktionen	56
H. Quantitative Bausteinanalyse der Schleimfraktionen	68
I. Molekulargewichtsbestimmung	85
II. Diskussion	91
III. Zusammenfassung	93
IV. Experimenteller Teil	95
V. Literaturverzeichnis	111

I. Allgemeiner Teil



Abb.: 1

A. Einleitung und Problemstellung

Die gemeine Stinkmorchel, *Phallus impudicus* L., zur Familie der Rutenpilze gehörig, ist in unseren Laub- und Nadelwäldern von Juni bis November häufig zu finden (1).

Die Entwicklung des Fruchtkörpers dieses Pilzes verläuft in zwei Abschnitten.

Zunächst bilden sich unterirdisch an dickeren Mycelsträngen rundliche Gebilde, die im Verlauf des Wachstums teilweise oder ganz an die Oberfläche treten.

Diese sogenannten Hexeneier (Abb. 2) haben eine schmutzigweiße Farbe, sind von ei- bis kugelförmiger

Gestalt und können bis enteneigroß werden. Ist so ein Hexenei ausgewachsen, setzt der rasch verlaufende zweite Entwicklungsabschnitt ein. Der eingeschlossene Fruchtkörper durchbricht seine Umhüllung und schiebt in einem schnellen Streckungsprozeß seinen mächtigen hohlen schwammigporösen Stiel heraus, der an seiner Spitze einen glockenförmigen Hut trägt. Auf der Außenseite des Hutes befindet sich eine dunkelolivgrüne, die Sporen enthaltende Masse, die Gleba, die einige Zeit nach dem Austreiben schmierig wird und den charakteristischen Aasgeruch entwickelt.

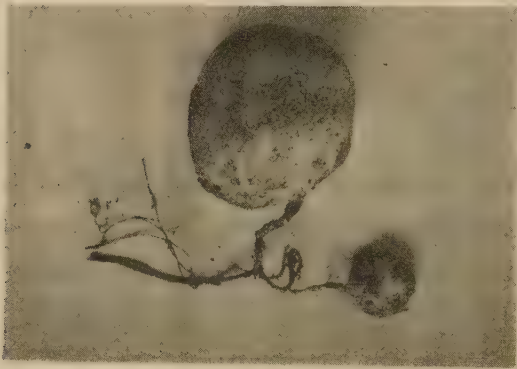


Abb.: 2

Zerschneidet man eins der oben beschriebenen Hexen-
eier (Abb. 3), so sieht man im Inneren ein weißes
Mittelteil, das Receptaculum (Abb. 3a), das die An-
lage des späteren Stieles und Hutes darstellt. Das
Receptaculum ist umgeben von der dunkelolivgrünen
Gleba (Abb. 3b). Receptaculum und Gleba werden von
einer doppelten weißen Hülle, der Volva (Abb. 3c)
umfaßt, zwischen deren innerer und äußerer Haut eine
dicke bräunlich-gelb gallertige Schleimschicht
(Abb. 3d) eingelagert ist.



Abb.: 3

Die chemische und physikalische Untersuchung dieses Schleimes soll die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein.

Die Stinkmorchel, beziehungsweise das Hexenei, war schon wiederholt Gegenstand chemischer Untersuchungen. Eine Übersicht über die ältere Literatur findet sich bei C.REINHARD (2). In jüngster Zeit wurde von H.WIEGAND (3) und von P.H.LIST und B.FREUND (4) über Inhaltsstoffe der Stinkmorchel berichtet. Allerdings interessierte hier nicht die chemische Zusammensetzung des Schleimes, sondern das Hauptmerkmal der Stinkmorchel, ihr aasartiger Geruch.

Der Schleim des Hexeneies wurde bisher nicht untersucht.

B. Die Natur pflanzlicher Polysaccharide

Die natürlich vorkommenden Schleime bestehen aus Polysacchariden, hochmolekularen Substanzen, die aus einer mehr oder weniger großen Zahl von Monosacchariden oder Monosaccharidderivaten durch glykosidische Bindung aufgebaut sind. Die Bezeichnung Polysaccharid wird üblicherweise für Polymere mit mehr als 10 Monose-Bausteinen verwendet. Polysaccharide sind in der Natur, besonders aber im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie dienen im wesentlichen als Gerüst- und Reservestoffe und spielen auch für den Wasser- und Mineralhaushalt eine Rolle. Zum Teil haben sie auch speziellere Aufgaben zu erfüllen, wie zum Beispiel die Gummis, die dem Wundverschluß der Pflanzen dienen und so gefährdete Wundstellen gegen das Eindringen von Mikroorganismen schützen.

Eine Einteilung der Polysaccharide in übergeordnete Gruppen ist problematisch. Idealerweise sollte eine solche Einteilung auf der chemischen Zusammensetzung und Struktur basieren. Dies ist jedoch zur Zeit noch nicht möglich, da die heutigen Kenntnisse über den weitaus größeren Teil der bekannten Polysaccharide hierzu nicht ausreichen.

Zwar werden heute Polysaccharide, soweit möglich, dadurch gekennzeichnet, daß an den Stamm des oder der Bausteine das Suffix -an gehängt wird (allgemein: Homoglykan-Heteroglykan), jedoch wird mit der Angabe

der Bausteine allein keine befriedigende chemische Klassifizierung erreicht.

Im Allgemeinen faßt man die pflanzlichen Polysaccharide in folgenden großen Gruppen zusammen:

1. Stärke und andere Reservepolysaccharide
2. Cellulose und Hemicellulosen
3. Polyuronide
4. Gummis und Schleime

Diesen pflanzlichen Polysacchariden stehen die vorwiegend tierischen Polysaccharide gegenüber, wie Glykogen, Chitin und die Mucopolysaccharide. Jedoch sollen diese hier nicht näher in Betracht gezogen werden.

1. Stärke

Stärken kommen im Pflanzenreich als Reservematerial vor. Unter Stärken im engeren Sinne versteht man heute Polysaccharide, die aus Ketten von α -1:4-verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten aufgebaut sind, mit wäßriger Jodlösung eine blaue, rote oder braune Färbung ergeben, in Wasser unlöslich sind und als Körner vorkommen. Stärken bestehen aus einem Gemisch von zwei Polysacchariden, dem Amylopektin und der Amylose.

Amylopektin, der mengenmäßig größere Anteil, hat eine verzweigte Struktur, die Verzweigung erfolgt am C-Atom 6 der Glucose. Amylose dagegen ist ein lineares Polysaccharid.

Amylopektin ist aus etwa 3000 Monose-Einheiten aufgebaut, Amylose aus 300 - 350.

Neben den Stärken gibt es noch eine Reihe von weiteren Reservopolysacchariden, die aber definitionsgemäß keine Stärke darstellen.

2. Cellulose und Hemicellulosen

Cellulose ist das am weitesten verbreitete Gerüstpolysaccharid. Sie besteht je nach Ursprung aus 1300 - 5000 β -1:4-verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten. Die linearen Celluloseketten orientieren sich parallel zueinander, wodurch die Cellulose kristallinen Charakter erhält. Die Konstitution der Cellulose ist unabhängig von ihrer Herkunft, wenngleich die Feinstruktur etwas variieren kann.

Der Begriff "Hemicellulose" wurde von E. SCHULZE 1891 (5) geprägt. Er benutzte diesen Namen für Polysaccharide, die mit verdünntem Alkali aus Pflanzenmaterial extrahiert werden. Obwohl die Kenntnisse über Polysaccharide seit dieser Zeit sehr zugenommen

haben, hat sich an dieser recht ungenauen Definition nicht viel geändert. Heute werden solche Polysaccharide als Hemicellulosen bezeichnet, die mit verdünntem Alkali aus einem Cellulosematerial extrahiert werden (6).

So findet man heute unter den Hemicellulosen Polysaccharide, die sich in ihrem chemischen Aufbau sehr voneinander unterscheiden. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß nur in recht wenigen Fällen chemisch einheitliche Fraktionen isoliert werden konnten, so daß über die meisten Hemicellulosen nur sehr wenig ausgesagt werden kann.

Soweit untersucht, handelt es sich bei diesen Polysacchariden vorwiegend um Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht und kurzen Verzweigungen.

3. Polyuronide

In dieser Gruppe werden die Pektine und die Alginsäure zusammengefaßt. Sie sind im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Polysacchariden fast ausschließlich aus Uronsäurebausteinen zusammengesetzt.

Nach heutiger Kenntnis bestehen Pektine aus linearen Polymeren von α -1:4-verknüpfter D-Galakturonsäure, deren Carboxylgruppen teilweise oder ganz mit Methanol verestert sind. Die Alginsäure dagegen stellt lineare Polymere aus β -1:4-verknüpfter Mannuronsäure dar.

Diese kommen wahrscheinlich in der lebenden Pflanze als Calciumsalze vor.

Auch diese Polysaccharide sind Gerüstsubstanzen. Sie entstehen in jungen noch wachsenden Geweben. So findet man Pektine in den Mittellamellen von höheren Pflanzen, Alginsäure in solchen von Meeresalgen.

4. Gummis und Schleime

Diese beiden Polysaccharid-Gruppen werden im allgemeinen gemeinsam betrachtet, da eine Unterscheidung zwischen beiden anhand des chemischen Aufbaues nach dem heutigen Wissenstand nicht möglich ist.

Üblicherweise werden die Gummis als Pflanzenexsudate gekennzeichnet, die unter pathologischen Bedingungen gebildet werden. Unter Schleimen dagegen werden Polysaccharide verstanden, die durch Extraktion der verschiedenen Pflanzenteile mit Wasser erhalten werden. Die Funktion der Schleime ist, soweit bekannt, eine ganz andere, als die der Gummis. Sie sind als Feuchtigkeitsreserve für die Pflanzen von Bedeutung. Schleime können auf Grund ihrer Struktur mit ihren langen und oft verzweigten Ketten, die eine große Anzahl von Hydroxylgruppen enthalten, erhebliche Mengen an Wasser festhalten.

So stellt auch der Schleim des Hexenceies eine Feuchtig-

keitsreserve dar, die es der Stinkmorchel ermöglicht, selbst während Trockenperioden aus dem Hexenei auszutreiben.

Ein allgemeines Aufbauschema kann für diese Polysaccharide nicht angegeben werden. Auf die Aufbaumöglichkeiten der Gummis und Schleime werde ich noch zurückkommen.

In den letzten zwanzig Jahren hat die Literatur über Untersuchungen von Polysacchariden stark zugenommen, was wohl auf die Entwicklung neuer, leistungsfähiger Analysenmethoden zurückzuführen ist. Auch die Literatur über Pilzpolysaccharide hat zugenommen, jedoch in einem weitaus geringeren Ausmaß.

Bei der Durchsicht der Literatur der letzten siebzehn Jahre fällt auf, daß es kaum Arbeiten über Polysaccharide aus Basidiomyceten, zu denen auch die Stinkmorchel gehört, gibt.

Es folgt eine Übersicht über Pilze, deren Polysaccharide seit 1947 untersucht wurden (Übersicht nach Chemical Abstracts 1947 - 1964).

PHYCOMYCETEN

<i>Mucor javanicus</i> (8)	<i>Mucor hiemalis</i> (8)
<i>Mucor plumbeus</i> (8)	<i>Mucor racemosus</i> (12)
<i>Mucor spinosis</i> (8)	<i>Mucor rouxii</i> (9)
<i>Mucor adventitius</i> (8)	<i>Monodus subterreanus</i> (25)
<i>Mucor sivaticus</i> (8)	<i>Phytophthora infestans</i> (29)

ASCOMYCETEN

<i>Candida albicans</i> (7,10,24)	<i>Penicillium claviforme</i> (8)
<i>Candida reukaufii</i> (20)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (8,35)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (10)	<i>Penicillium griseo-fulvum</i> (8)
<i>Cryptococcus pulcherimus</i> (7)	<i>Penicillium islandicum</i> (8,14)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (21,22,23)	<i>Penicillium rugulosum</i> (8)
<i>Cryptococcus diffluens</i> (20)	<i>Penicillium luteum</i> (15,16)
<i>Torulopsis famata</i> (20)	<i>Penicillium charlesii</i> (32)
<i>Hansenula holstii</i> (33)	<i>Helminthosporium</i> sp. (8)
<i>Hansenula capsulata</i> (34)	<i>Fusarium lini</i> (8)
<i>Aspergillus orizae</i> (8)	<i>Fusarium moniliforme</i> (8,28)
<i>Aspergillus nidulans</i> (8)	<i>Botritis cinerea</i> (27)
<i>Aspergillus niger</i> (8)	<i>Sclerotinia libertiana</i> (18)
<i>Aspergillus terreus</i> (8)	<i>Monilia mortifera</i> (7)
<i>Aspergillus parasiticus</i> (13)	

BASIDIOMYCETEN

<i>Polystictus versicolor</i> (17,19)	<i>Amanita strobiliforme</i> (19)
<i>Polyporus giganteus</i> (26)	<i>Auricularia auricula</i> (30,31)

Chemischer Aufbau der Gummis und Schleime

In den natürlichen Gummis und Schleimen ist bisher von allen Polysacchariden die größte Zahl verschiedener Zuckerbausteine gefunden worden. Bis vor einigen Jahren galt es als noch nicht sicher, ob fünf die maximale Zahl der am Aufbau eines Polysaccharids beteiligten verschiedenen Zuckerbausteine darstellt (36). In jüngerer Zeit ist jedoch in Kamillenblüten ein Polysaccharidschleim mit sechs Bausteinen entdeckt (37) und die Einheitlichkeit des Schleimes nach H. JANECKE und W. KEHR (38) mittels Elektrophorese bewiesen worden. Es wurde in einigen Fällen in Polysacchariden eine noch größere Zahl von Zuckerbausteinen gefunden (39,40), jedoch wurde der Nachweis der Einheitlichkeit der geprüften Schleime nicht erbracht.

Wenn man berücksichtigt, daß jeder dieser Bausteine wieder mit bis zu vier Zuckern verknüpft sein kann, ergeben sich die mannigfaltigsten Aufbaumöglichkeiten. Erfahrungsgemäß setzen sich Polysaccharide jedoch aus einer relativ kleinen Zahl von Zuckern und deren Derivaten zusammen:

Pentosen: L-Arabinose, D-Xylose,

Methylpentosen: L-Rhamnose, L-Fucose,

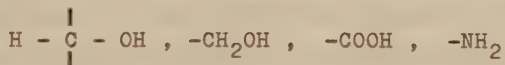
Hexosen: D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, D-Fructose

Aminzucker: D-Glucoamin,

Uronsäuren: D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure,
D-Mannuronsäure

Darüber hinaus wurden noch andere Zucker gefunden wie D-Ribose, Desoxy-D-Ribose, verschiedene Heptosen und andere, man kann dies jedoch bisher als Ausnahmen von der Regel bezeichnen.

Die funktionellen Gruppen der Polysaccharide



können anorganisch oder organisch substituiert sein.

Es handelt sich dabei vor allem um Schwefelsäure, zum Beispiel bei den Polysacchariden aus vielen Meeresalgen, und um Phosphorsäure, zum Beispiel bei verschiedenen Bakterienpolysacchariden. Als organische Substituenten finden wir hauptsächlich Methyl- und Acetyl-Gruppen.

Im Gegensatz zu Polysacchariden wie Cellulose oder Amylose sind die Gummis und Schleime verzweigt-kettig aufgebaut. Die Reihenfolge der einzelnen Zuckerbausteine innerhalb dieser Ketten kann sehr verschieden sein. Die Bausteine können statistisch oder nach einem bestimmten Muster angeordnet sein. Bei Carubin und Guarán besteht zum Beispiel die Hauptkette aus Polymannose, die Seitenäste aus Galactose.

Man ist heute jedoch nur bei wenigen Polysacchariden über die Reihenfolge der Bausteine einigermaßen informiert (z.B. bei Gummi arabicum).

Die glykosidische Bindung kann innerhalb eines Polysaccharidmoleküls einheitlich oder unterschiedlich sein. Sind Polysaccharide aus verschiedenen Zuckern

aufgebaut, so können die einzelnen Bausteine meist einem Bindungstyp zugeordnet werden. Glucose zum Beispiel findet sich meist in 1:4-glykosidischer Bindung, während Galactose die 1:3- und die 1:6-glykosidische Bindung vorzieht.

Darüber hinaus kann der Halbacetalring der einzelnen Zuckerbausteine als Furanose- oder Pyranoseform vorliegen und die Konfiguration der Bindung kann α - oder β -glykosidisch sein.

In Anbetracht all dieser Aufbaumöglichkeiten wird es verständlich, daß die natürlichen Gummis und Schleime nicht nur sehr differenziert aufgebaute Polysaccharide sein können, sondern mit zu den kompliziertesten uns bekannten Naturstoffen zählen.

Es war nicht möglich im Rahmen dieser Arbeit auf die Vielfalt der oben angeführten Fragen einzugehen. Es wurden einige zur Kenntnis des Hexeneischleimes wichtige Eigenschaften untersucht.

C. Gewinnung und Reinigung des Hexeneischleimes

Ein frisches Hexenei enthält je nach Größe etwa 15 - 35 g Naßschleim mit einem Trockengehalt von 2 - 2,3 %. Der Schleim, der den in dieser Arbeit beschriebenen physikalischen und chemischen Untersuchungen diente, wurde jedoch nicht aus frischen Hexeneiern gewonnen, sondern aus solchen, die durch Einlegen in Aethanol konserviert worden waren. Dies erwies sich als notwendig, da die Hexeneier in der Lüneburger Heide gesammelt wurden und nicht an Ort und Stelle aufgearbeitet werden konnten.

Die Hexeneier, in denen durch das Konservieren in Aethanol der Schleim als eine koagulierte feste Schicht vorlag, wurden von der äußeren Hülle befreit. Die nun freiliegende Schleimschicht wurde abgeschabt und in Wasser gelöst, so daß eine etwa 0,5%ige Lösung entstand. Diese Lösung wurde durch Zentrifugieren bei 10 000 U/min von groben Verunreinigungen, wie Gewebsfragmenten, die durch das Schälen und Abschaben in den Schleim gelangt waren, befreit. Die klare Schleimlösung wurde lyophilisiert. Der so erhaltene Trockenschleim wird im folgenden als Rohschleim bezeichnet.

Dieser Trockenschleim hatte einen Aschegehalt von 10,65 % und einen Sulfataschegehalt von 17,08 %.

Die Asche wurde röntgenfluoreszenzspektrographisch untersucht ⁺⁾ . Es wurden die Elemente Na, K, Rb, Mg, Ca, Sr, Ba, Zn, Mn, Ti, Fe, Cu, Ni gefunden. Weiterhin enthielt der Rohschleim 2,44 % organisch gebundenen Stickstoff und 2,67 % Schwefel, der nicht als Sulfat gebunden war. Mit der auf Seite 62 geschilderten papierchromatographischen Methode konnte im Rohschleim freie Glucose nachgewiesen werden.

Die Reinigung des Rohschleims erfolgte durch Behandeln von 0,25%igen Rohschleimlösungen mit Kationenaustauscher in der H^+ -Form (Amberlite IR 120) und anschließender 72-stündiger Dialyse gegen destilliertes Wasser. Die Trocknung erfolgte durch Lyophilisation.

Der so gereinigte Rohschleim, im folgenden als gereinigter Gesamtschleim bezeichnet, war aschefrei, frei von Stickstoff und Schwefel sowie von niedermolekularen Substanzen. Auf diesem Wege wurde auch der Polysaccharidgehalt des Rohschleimes ermittelt, er betrug 66 %.

Im Gegensatz zu dem Rohschleim war dieser gereinigte Gesamtschleim nur noch teilweise löslich, er löste sich jedoch vollständig in 0,05 n Natronlauge.

⁺⁾ Den Herren Dr. G. Stork und Dr. K. Müller, Institut für analytische Chemie der Universität Marburg, die die Bestimmung durchführten, bin ich zu Dank verpflichtet.

D. Rheologische Untersuchung des Hexeneischleimes

Das augenfälligste Kennzeichen des Hexeneischleimes ist dessen hohe Viskosität. In frischem Zustand liegt der Schleim im Hexenei in gelartigen, schwerfließbaren Schleimklumpen vor. Es erschien daher interessant, das rheologische Verhalten dieses Schleimes näher zu untersuchen.

Das rheologische Verhalten einer Substanz kann nur durch eine Fließkurve oder, was im Prinzip aber dasselbe ist, eine Viskositätskurve hinreichend charakterisiert werden. Das Fließverhalten einer Substanz wird durch eine ihm eigene, der Form nach ganz charakteristische Fließkurve gekennzeichnet. Die Fließkurven der vier Grundtypen des Fließverhaltens, des idealviskosen, des pseudoplastischen, des dilatanten und des plastischen, sind in Fig. 1 zusammengestellt.

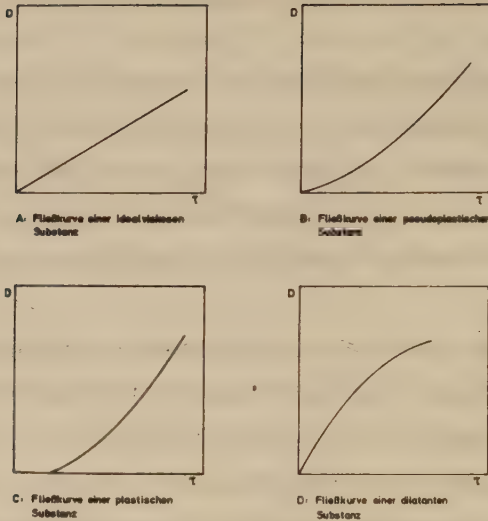


Fig. 1

Die Punkte einer Fließkurve ergeben sich beim Auftragen der Schubspannung τ gegen das Schergefälle D im Koordinatensystem.

Die Schubspannung τ ist gegeben durch

$$\tau = \frac{K}{F} \left[\text{dyn} : \text{cm}^{-2} \right]$$

worin K die auf die Fläche F einwirkende Kraft darstellt. Das Schergefälle D stellt den Geschwindigkeitsunterschied zweier benachbarter Substanzschichten im Abstand y dar und ist gegeben durch

$$D = \frac{v}{y} \left[\text{sec}^{-1} \right]$$

Die Beziehung zwischen der Schubspannung τ , dem Scher-
gefälle D und der Viskosität η wird durch den Newton-
schen Ansatz $\tau = \eta \cdot D$ hergestellt.

Die Viskosität errechnet sich also nach

$$\eta = \frac{\tau}{D} \quad \left[\frac{\text{dyn} \cdot \text{sec}}{\text{cm}^2} \right]$$

Rotationsviskosimeter, mit denen solche Fließkurven
ermittelt werden können, werden in den verschiedensten
Varianten hergestellt. Eine umfassende Übersicht über
diese Geräte geben A. N. MARTIN und G. S. BAKER (41).
Mir stand für meine Arbeiten ein unter der Bezeichnung
Rotovisko von der Firma Haake, Berlin, in den Handel
gebrachtes Rotationsviskosimeter zur Verfügung.
In Rotationsviskosimetern können verschiedene Meß-
systeme Verwendung finden. Das gebräuchlichste ist die
sogenannte Couette-Meßeinrichtung. Diese besteht aus
zwei konzentrisch ineinander angeordneten Zylindern,
von denen einer, im Falle des Rotovisko der innere,
von einem Elektromotor angetrieben wird, während der
andere fest fixiert angeordnet ist. In dem Ringspalt
zwischen beiden Zylindern befindet sich die Meßsubstanz.
An den meisten Geräten, so auch beim Rotovisko, wird
das Schergefälle D, durch ein Wechselgetriebe variier-
bar, über die Umdrehungsgeschwindigkeit des beweglichen
Zylinders fest vorgegeben und errechnet sich aus den
Zylinderradien und der Winkelgeschwindigkeit.

Die Schubspannung τ ist in Abhängigkeit von dem Schergefälle und der Meßsubstanz variabel. Sie errechnet sich aus dem am Drehkörper angreifenden Drehmoment und dem Zylinderradius.

Für den praktischen Gebrauch des Rotovisko werden vom Hersteller vereinfachte Gleichungen zur Errechnung von τ und D angegeben:

$$D = \frac{B}{U} \quad \left[\text{sec}^{-1} \right]$$

$$\tau = A \cdot S \quad \left[\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2} \right]$$

B stellt hier den sog. Scherfaktor, U den sog. Geschwindigkeitsfaktor und A den sog. Schubfaktor dar. Diese Faktoren, in denen die Gerätekonstanten zusammengefaßt werden, können dem Eichschein zum Rotovisko entnommen werden. S dagegen sind die Skalenteile, die bei der Messung am Gerät abgelesen werden können.

Es wurden nun Fließkurven einer 1 % Rohschleimlösung und einer 1%igen Lösung des gereinigten Gesamtschleimes in 0,05 n Natronlauge erstellt.

Um die unteren Fließkurventeile besonders genau messen zu können, wurde, außer bei den zehn direkt einstellbaren Rotationsgeschwindigkeiten, durch den Einbau eines Zwischengetriebes, das die Rotationsgeschwindigkeiten im Verhältnis 10:1 herabsetzt, noch bei zehn weiteren niedrigen Geschwindigkeiten gemessen. Die

Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Nach diesen wurden die unter Fig. 2 und 3 abgebildeten Fließkurven gezeichnet.

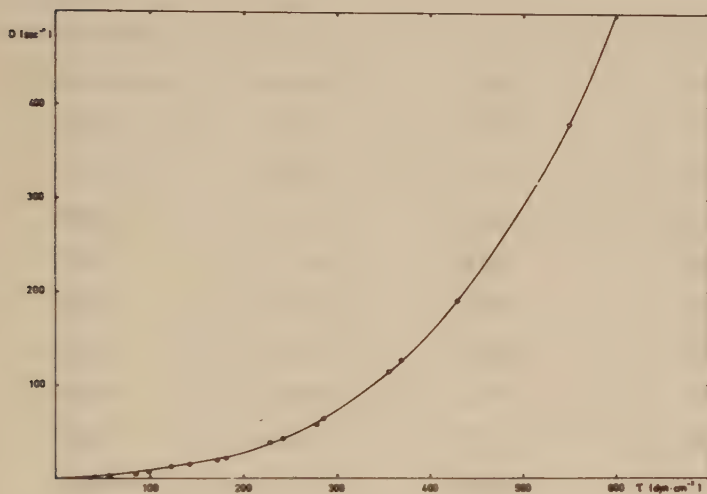


Fig. 2 Fließkurve einer 1%igen wäbr. Rohschleimlösung

Tab. 1

Werte zur Fließkurve einer 1%igen wäßr. Rohschleimlösung

Geschwindig- keitsfaktor	Schergefälle	Skalenteile	Schubspannung
U	D	S	τ
1620	0,7	0,75	21,4
810	1,41	1,5	42,9
540	2,12	2,0	57,2
270	4,23	3,0	85,8
180	6,35	3,5	100,1
90	12,7	5,0	143,0
60	19,02	6,0	171,5
30	38,03	8,0	229,0
20	57,1	9,75	279,0
10	114,2	12,5	368,0
162	7,05	3,5	100,1
81	14,1	5,0	143,0
54	21,15	6,25	179,0
27	42,3	8,5	243,0
18	63,5	10,0	286,0
9	126,9	13,25	379,0
6	190,2	14,5	415,0
3	380,2	19,25	550,0
2	571,0	21,75	622,0
1	1142,0	28,0	800,0

Meßkörper MV I:

Schubfaktor A = 28,6

Geschwindigkeitsfaktor B = 1142

Meßtemperatur 20° C.

Tab. 2

Werte zur Fließkurve einer 1%igen Lösung von gereinigtem
Gesamtschleim in 0,05 n Natronlauge:

Geschwindig- Schergefälle Skalenteile Schubspannung
 keitsfaktor

U	D	S	τ
1620	1,6	0,75	11,7
810	3,2	1,0	15,6
540	4,8	1,25	19,5
270	9,7	1,5	23,4
180	14,5	1,75	27,3
90	28,1	2,75	42,9
60	43,7	3,5	54,7
30	87,4	5,5	85,9
20	131,0	7,0	109,1
10	262,0	11,0	171,5
162	16,4	2,0	31,2
81	32,4	3,0	46,8
54	48,5	3,75	58,5
27	97,2	5,75	89,7
18	145,6	7,5	117,0
9	281,0	11,75	183,2
6	437,0	16,0	249,9
3	874,0	26,0	406,0
2	1310,0	35,0	546,0
1	2620,0	55,0	859,0

Meßkörper NV :

Schubfaktor A = 15,6

Geschwindigkeitsfaktor B = 2620

Meßtemperatur 20° C.

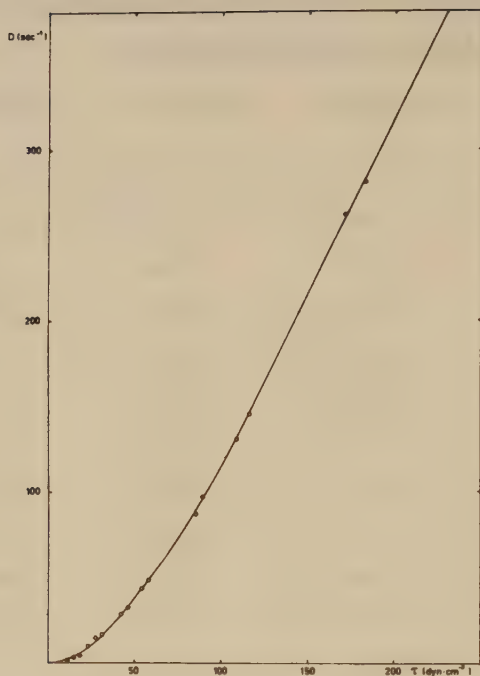


Fig. 3 Fließkurve einer 1%igen Lösung von gereinigtem Gesamtschleim in 0,05 n Natronlauge

Beide Schleimlösungen zeigen, wie aus den Fließkurven ersichtlich, pseudoplastisches Fließverhalten: Es kommt bei zunehmender Scherbeanspruchung zu einer Abnahme der Viskosität, wie bei allen Lösungen von Hochpolymeren, eine Fließgrenze ist nicht zu erkennen,

es liegt also keine Gelstruktur vor. Dieses Fließverhalten gilt als typisch für die Polysaccharidschleime. Darüber hinaus ist auffällig, daß die Rohschleimlösung erheblich höhere Viskositäten aufweist als die des gereinigten Gesamtschleimes. Das ist wohl auf bestimmte mineralische Kationen zurückzuführen. Dieses Verhalten erinnert an Alginsäurelösungen, deren Viskositäten durch Zusatz von mehrwertigen mineralischen Kationen, wie z. B. Calciumionen, ebenfalls erheblich erhöht werden können.

Versuche, mit Zuckerlösungen in weinsaurem Milieu den Hexeneischleim, analog zu den Pektinlösungen, in ein Gel zu überführen, hatten keinen Erfolg. Rückschlüsse auf die Struktur des Schleimes können daraus jedoch nicht abgeleitet werden, da der Mechanismus der Pektinigelierung bis heute noch weitgehend unabgeklärt ist.

E. Untersuchung der Einheitlichkeit von Polysacchariden

Das Problem der Bestimmung der Einheitlichkeit von Polysacchariden ist für die gesamte Chemie dieser Stoffklasse von grundlegender Bedeutung. Die Frage nach der Einheitlichkeit eines Polysaccharides kann zur Zeit noch nicht befriedigend beantwortet werden. Es ist zweifelhaft, ob derzeit von irgendeinem Polysaccharid, nach Prüfung mit allen zur Verfügung stehenden Methoden, gesagt werden kann, es sei unzweideutig homogen. Das kann nicht von der Stärke gesagt werden, die ja relativ einfach aufgebaut ist, entsprechend weniger kann diese Aussage für die viel komplizierter aufgebauten Polysaccharide der natürlichen Gummis und Schleime gemacht werden. In diesem Punkt ist auch die große Unsicherheit begründet, die die Polysaccharidforschung heute noch, trotz umwälzender Neuerungen auf dem Gebiet der analytischen Methodik, beherrscht. Aussagen über die Struktur von Polysacchariden werden sozusagen unter Vorbehalt gemacht. Dies ist bei den kompliziert aufgebauten Polysacchariden wie Hemicellulosen, Gummis und Schleimen besonders auffällig. Die Zuordnung von natürlichen Polysacchariden zu diesen Gruppen geschieht ausschließlich nach nichtchemischen Gesichtspunkten, wie schon eingangs erwähnt, und zwar im wesentlichen, weil ungewiß ist, ob die bisher erarbeiteten Ergebnisse, in Ermangelung eines unzweideutigen Einheitlichkeitsbeweises, als richtig angesehen werden können.

Ein anderes Problem berührt das der Homogenität eines Polysaccharides sehr eng, es ist das Problem der Polymolekularität. Unter der Polymolekularität von Polysacchariden versteht man das Auftreten verschieden großer Polysaccharidketten bei sonst gleicher Struktur.

Es ist gut vorstellbar, daß durch die Biosynthese von Polysacchariden zwar vorzugsweise bestimmte Molekülgrößen erhalten werden, daß aber, bedingt durch das Kettenwachstum, Übergänge bezüglich der Molekülgröße bestehen.

Es sind schon Polysaccharidpräparate beschrieben worden, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes als einheitlich erwiesen haben, jedoch sind die polymolekularen Polysaccharide weitaus häufiger.

Das Problem der Polymolekularität wirft ein weiteres Licht auf die schwierige Situation des Einheitlichkeitsnachweises von Polysacchariden.

1. Methoden zum Beweis der Einheitlichkeit von Polysacchariden

Nach der einfachsten, aber auch heute noch sehr häufig angewandten Methode geht man so vor, daß man Polysaccharide solange zu reinigen beziehungsweise zu fraktionieren versucht, bis sich die Zuckerbausteinzusammensetzung nicht mehr ändert. Diese Methode kann

natürlich keine befriedigenden Ergebnisse liefern, hat aber den Vorteil, keinen apparativen Aufwand zu erfordern.

a. Einheitlichkeitsnachweis mittels Ultrazentrifuge:

Die Untersuchung der Sedimentation von Polysacchariden in der Ultrazentrifuge ist eine universell anwendbare Methode und hat als Homogenitätsnachweis weite Verbreitung gefunden. Die Polysaccharide eines Gemisches sedimentieren im Schwerfeld der Ultrazentrifuge entsprechend ihrem Molekulargewicht. Das Sedimentationsverhalten der Polysaccharide kann mittels eines optischen Systems sichtbar gemacht werden, und man kann so die Zahl der verschiedenen vorliegenden Fraktionen erkennen.

Jedoch sind auch dieser Methode Grenzen gesetzt. So ist es zum Beispiel möglich, daß zwei Komponenten mit nur geringfügig verschiedenen Molekulargewichten im sogenannten Schlierenbild dicht beieinander liegen und sich auf Grund der Molekulargewichtsverteilung überlappen, so daß der Eindruck entsteht, es handle sich hier um eine einheitliche Fraktion. Auch können auf Grund der Anwesenheit von Uronsäuren im Molekül Assoziate entstehen, deren Schlierenbild dann falsch interpretiert wird.

b. Einheitlichkeitsnachweis mittels Elektrophorese:

Die Träger-Elektrophorese hat sich in neuerer Zeit zu einem wertvollen Werkzeug zur Untersuchung der Einheitlichkeit von Polysacchariden, besonders aber von sauren Polysacchariden entwickelt. Aber auch die Ergebnisse dieser Methode können nur mit dem üblichen Vorbehalt betrachtet werden. Wie von K.NISIZAWA und P.PIGMAN (42) berichtet wurde, und wie auch bei der Untersuchung des Hexeneischleimes beobachtet werden konnte, ist es möglich, daß ein Polysaccharidpräparat in verschiedenen Puffern elektrophoretisch einheitlich wandert, sich aber mit anderen Methoden als heterogen erweist. Als Träger wurden neben Papier auch andere Materialien mit Erfolg angewendet, wie Seide (43) und Celluloseacetat (44). Besonders aber hat sich die Verwendung von Glasfaserpapier als Träger bewährt (38, 45, 46, 47, 48).

Besondere Vorteile bei der Verwendung von Glasfaserpapier sind einmal darin zu sehen, daß eine möglicherweise auftretende Beeinflussung der Wanderung der Polysaccharide auf Grund von Adsorption oder Assoziation durch Papier umgangen wird. Zum anderen stellt Glasfaserpapier ein chemisch inertes Material dar, so daß sich die Detektion der Polysaccharide auf dem Träger erheblich einfacher gestaltet. So können zum Sichtbarmachen der Polysaccharidflecken aggressive Sprühreagenzien, wie Kaliumpermanganatlösung in Natronlauge oder 1-Naphthollösung in Schwefelsäure,

herangezogen werden, was bei einem Papierträger unmöglich wäre, da sich hier das ganze Papier anfärben würde. Auch eventuelle quantitative Bestimmungen der Fraktionen gestalten sich einfacher, da bei der Extraktion der Fraktionen aus dem Träger keine störenden Kohlenhydrate mit herausgelöst werden können. Als Puffer wurden vor allem Boratlösungen (pH 8-11) eingesetzt (32, 38, 49, 50) aber auch Acetat-Puffer (51) und Barbiturat-Puffer (44, 52, 53, 54) fanden Verwendung. Von besonderen Trenneffekten, die mit den üblichen Puffern nicht erreicht werden, berichteten B.A.LEWIS und F.SMITH (48), die mit Glasfaserpapier und 2 n Natronlauge als Elektrolytflüssigkeit arbeiteten. Diese Ergebnisse sind jedoch in neuerer Zeit nicht bestätigt worden, und auch in der vorliegenden Arbeit konnte mit dieser Methode keine Trennung erzielt werden.

Zum Sichtbarmachen der Polysaccharidflecken auf dem Träger können die schon erwähnten Reagenzien Kaliumpermanganatlösung in Natronlauge und 1-Naphthollösung in Schwefelsäure verwendet werden (45). Neben diesen sind auch andere Detektionsmittel angewandt worden, so Perjodsäure-Parafuchsin (55). Speziell zum Sichtbarmachen saurer Polysaccharide wurden Toluidinblau (56), Alcian-Blau GN8 (44, 57) sowie Bromkresolrot, nach vorheriger Fällung der sauren Polysaccharide auf dem Träger mit Cetyltrimethylammoniumbromid (58), gebraucht.

Neben diesen allgemein anwendbaren Methoden zur Untersuchung der Einheitlichkeit von Polysacchariden sind auch noch andere in der Literatur beschrieben worden, so immunologische und enzymatische Methoden. Jedoch sind diese zur Zeit noch nur sehr speziell anwendbar.

2. Untersuchung der Einheitlichkeit des Hexeneischleimes mittels Elektrophorese

Um die Frage nach der Einheitlichkeit des Hexeneischleimes zu beantworten, wurde er unter Anwendung von 0,1 m Borax-Puffer sowie 2 n Natronlauge der Elektrophorese auf Glasfaserpapier unterworfen.

In Puffer oder Elektrolytflüssigkeit war eine Trennung des Hexeneischleimes in mehrere Fraktionen nicht zu beobachten. Es fiel allerdings auf, daß in Borax-Puffer der gereinigte Gesamtschleim (Fig. 4 B) als einheitlicher Fleck weiter wanderte, als der Rohschleim (Fig. 4 A).

Es soll hier vorweggenommen werden, daß es im weiteren Verlauf dieser Arbeit gelang, den Hexeneischleim an DEAE-Cellulose zu fraktionieren. Diese Fraktionen wurden ebenfalls der Elektrophorese unterworfen.

Auch diese Fraktionen wanderten als einheitliche Flecken, hatten jedoch so verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten, daß eine Unterscheidung der einzelnen Fraktionen untereinander ohne weiteres möglich war (Fig. 4, 1-6).

Das unter Fig. 4 abgebildete Elektropherogramm wurde in 0,1 m Borax-Puffer bei einer Spannung von 1000 V und einer Wanderungszeit von 2 Stunden erstellt. Die Numerierung der Fraktionen entspricht der auf Seite getroffenen.

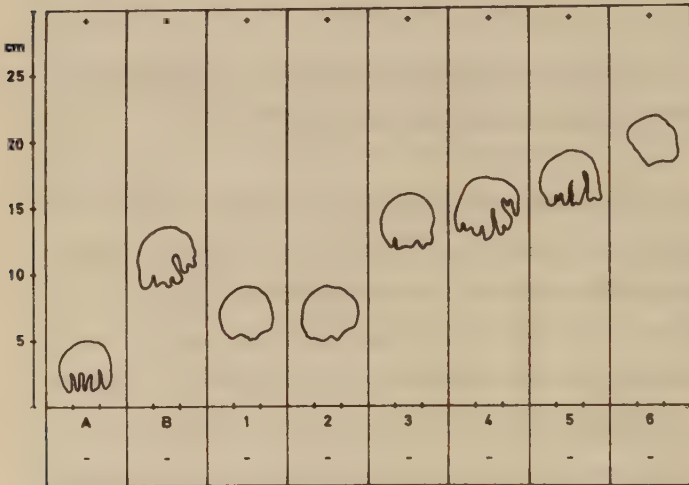


Fig. 4 Elektropherogramm des Rohschleimes (A), des gereinigten Gesamtschleimes (B) und der Fraktionen 1-6 in 0,1 m Borax-Puffer. Spannung 1000 V, Laufzeit 2 Stunden.

Es wurde hiermit ein weiterer Beweis erbracht, daß, falls es nicht gelingt, Polysaccharidmaterial zu zerlegen, dies keineswegs als Beweis für die Einheitlichkeit dieses Materials angesehen werden kann.

F. Fraktionierung von Polysacchariden

Nachdem sich der Hexeneischleim elektrophoretisch nicht zerlegen ließ, sollte eine Fraktionierungsmethode gefunden werden, mit der es unter Umständen doch möglich war, eine Trennung zu erzielen.

1. Fraktionierungsmethoden

Die Fraktionierung mit Fällungsmitteln war lange Zeit die einzige Möglichkeit, bestimmte Polysaccharide aus Gemischen abzutrennen. Mit der Entwicklung moderner Methoden, vor allem der Gelfiltration, der Cellulose-Ionenaustauschchromatographie sowie der präparativen Elektrophorese, haben diese Methoden etwas an Bedeutung verloren. Zwar werden sie auch heute noch sehr häufig angewandt, jedoch kommt ihnen eher der Charakter einer Vorreinigung oder Vorfraktionierung zu.

Von den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Verfahren soll hier eine Übersicht über die gebräuchlichsten gegeben werden.

a. Fraktionierte Flockung von Polysacchariden aus wäßriger Lösung durch "Nichtlösungsmittel" wie Aethanol oder Aceton (60).

Als Fraktionierungsmethode ist dieser Weg weniger

geeignet, da ein Mitfällen von anderen Polysacchariden, beziehungsweise deren Einschluß bei der Fällung, kaum verhindert werden kann. Jedoch ist dies auch heute noch die verbreitetste Methode Polysaccharide zu reinigen, das heißt von niedermolekularen Substanzen zu befreien und ihren Aschegehalt zu erniedrigen.

b. Fraktionierte Flockung mit Salzen wie Ammoniumsulfat(61)

c. Spezifische Flockung durch Komplexbildung mit Kupferionen (62,63), mit Borat (64) und mit Bariumhydroxid (65). Bariumhydroxid ist in neuerer Zeit verwendet worden, um Polysaccharide zu fällen und zu reinigen, die β -1:4-verknüpfte D-Mannose enthalten. Auf diese Weise gelang es zum Beispiel, Xylane und Mannane von einander zu trennen (66 - 71). Weiterhin ist diese Methode zur Reinigung eines Galactans angewandt worden, dessen Hauptkette aus β -1:4-verknüpfter D-Galactose bestand (72).

Auch Polysaccharidmaterial, das Uronsäuren enthält, wird durch Bildung unlöslicher Bariumsalze gefällt.

d. Flockung mit langkettigen quartären Ammoniumbasen wie Cetyltrimethylammoniumbromid, Cetylpyridiniumchlorid oder Cetyltrimethylbenzylammoniumchlorid.

Da saure Polysaccharide mit diesen Reagenzien in Wasser schwerlösliche Niederschläge bilden, wird diese Methode sehr häufig angewandt um Gemische von sauren und neutralen Polysacchariden zu zerlegen (58, 73-80).

e. Präparative Zonenelektrophorese an vertikalen Glaspulversäulen (81-83)

f: Chromatographische Methoden.

Wirkungsvolle chromatographische Methoden stellen bei der Aufarbeitung von Naturstoffgemischen das wertvollste Handwerkzeug dar. Der Polysaccharidanalytik stehen mit der Gelfiltration an Dextrangelen und der Ionenaustauscherchromatographie erst seit neuester Zeit brauchbare chromatographische Methoden zur Verfügung.

Es sind auch einige andere chromatographische Verfahren beschrieben worden, so die Fraktionierung von Stärke an Aluminiumoxid (84-86), von O-Acetylaraban an Kohle (87,88) und die fraktionierte Elution von Polysacchariden, die auf Cellulosesäulen ausgefällt wurden (89,90). Diese Methoden haben jedoch keine Bedeutung erlangt.

α. Gelfiltration

Die Gelfiltration an dreidimensional vernetzten Dextranen ist ein chromatographisches Verfahren, das es erlaubt, Moleküle auf Grund ihrer Größe zu trennen (91,92).

Solche dreidimensional vernetzten Dextrane sind unter der Bezeichnung Sephadex im Handel. Dieses Material ist stark hydrophil und quillt in Wasser zu einem Gel. Die einzelnen Sephadex-Partikel haben je nach Vernetzungsgrad eine bestimmte Porenweite. Entsprechend der

Molekülgröße können die Substanzen, die an diesem Material chromatographiert werden, in die Partikel eindringen oder sie werden ausgeschlossen und erscheinen so verschieden schnell im Eluat. Auf diese Weise können Substanzen entsprechend ihrer Molekülgröße getrennt werden.

Diese Methode hat in der Analytik von makromolekularen Substanzen sehr weite Verbreitung gefunden und ist auch zur Trennung von Polysaccharidgemischen erfolgreich eingesetzt worden (93,94).

B. Ionenaustauschchromatographie

Erste Versuche, Polysaccharide an Anionenaustauschern zu chromatographieren (95), blieben wenig erfolgreich, da die Polysaccharide lediglich an der Harzoberfläche festgehalten werden, und die Austauschkapazität der Harze nur zu einem kleinen Teil ausgenutzt werden kann. Sehr gut geeignet dagegen erwies sich die 1956 von H. A. PETERSON und E. A. SOBER (96,97) in die Proteinchromatographie eingeführte Diaethylaminoethylcellulose (DEAE-Cellulose), die von H. NEUKOM, H. DEUEL, W. J. HERI und W. KÜNDIG (98) 1959 erstmals für die Polysaccharidchromatographie verwendet wurde.

Diese Methode hat in der Polysaccharidanalytik weite Verbreitung gefunden. Sie wurde erfolgreich eingesetzt zur Fraktionierung von Mucopolysacchariden (99, 100), von Pektinsubstanzen (101 - 104), von Bodenpolysacchariden (105) und von Pflanzengummis, wie Gummi arabicum und Traganth (78, 79).

Von den angeführten Methoden wurden zur Fraktionierung des Hexeneischleimes die Fällung mit Cetyltrimethylammoniumchlorid, die Gelfiltration an Sephadex und die Chromatographie an DEAE-Cellulose herangezogen. Jedoch wurde nur mit letzterer eine gute Fraktionierung des Schleimes erzielt.

Eine Trennung der sauren Polysaccharide von den neutralen mittels Fällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid, als Vorfraktionierung gedacht, gestaltete sich schwierig, da es bei der Aufarbeitung der Fällung nicht gelang, diese völlig in Lösung zu bringen. Zum anderen war bei der Rückgewinnung der Polysaccharide mittels Aethanolfällung der Verlust an Polysacchariden so groß, daß in Anbetracht der beschränkten Menge des zur Verfügung stehenden Analysenmaterials dieser Weg nicht beschritten werden konnte.

Auch die Gelfiltration an Sephadex erbrachte nicht den erwarteten Erfolg, da die Viskosität des Schleimes zu hoch war. Eine 1%ige Rohschleim-Lösung führte zur völligen Verstopfung der Säule (Sephadex G 50). Der Einsatz einer 0,1%igen Schleimlösung, mit der ein ausreichender Durchfluß erreicht werden konnte, verbot sich wegen zu geringer Ausbeute und mangelnder Trennschärfe.

Jedoch erwies sich die Chromatographie an DEAE-Cellulose als äußerst erfolgreiche Fraktionierungsmethode. Es gelang damit den Hexeneischleim zu zerlegen.

2. Fraktionierung des Hexeneischleimes an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose kann zur Fraktionierung von sauren aber auch von neutralen Polysacchariden herangezogen werden. Saure Polysaccharide werden an DEAE-Cellulosesäulen bei einem pH-Wert nahe 6 vollständig adsorbiert. Eluiert werden sie entsprechend ihrem Gehalt an sauren Gruppen

- a) bei demselben pH-Wert mit zunehmender Pufferkonzentration (nur bei schwach sauren Polysacchariden)
- b) mit alkalischen Lösungen zunehmender Ionenstärke.

Neutrale Polysaccharide werden bei einem pH-Wert der Säule von 5-6 gar nicht oder nur schwach adsorbiert. Sie werden bei alkalischer Reaktion der Säule zurückgehalten und ebenfalls mit alkalischen Lösungen mit zunehmender Ionenstärke eluiert.

Neutrale Polysaccharide können auch mit Vorteil in Form der negativ geladenen Borkomplexe fraktioniert werden.

Die Adsorption von Polysacchariden an DEAE-Cellulose ist sehr von der Struktur abhängig. Im allgemeinen kann angenommen werden, daß die Adsorption mit steigendem Anteil an sauren Gruppen im Molekül zunimmt. Bei homologen Serien linearer Polysaccharide wird das niedrigmolekulare Material weniger festgehalten als das höhermolekulare. Darüber hinaus wird die Adsorption an dem Säulenmaterial auch noch von der Molekülgestalt der Polysaccharide beeinflusst, lineare Komponenten werden stärker festgehalten als verzweigte.

Zunächst wurde mit einer kleinen Säule unter Einsatz von 100 mg Rohschleim gearbeitet, um die Wirksamkeit dieser Fraktionierungsmethode kennenzulernen. Zur Entwicklung wurde die stufenweise Elution mit Lösungsmitteln steigender Elektrolytkonzentration und steigenden pH-Werten gewählt. Sie hat gegenüber der Elution mittels eines Konzentrationsgradienten den Vorteil, sauberere und kompaktere Fraktionierungen zu ergeben.

Es wurde der Reihe nach mit folgenden Lösungsmitteln eluiert:

- 1) Wasser
- 2a) 0,05 m Phosphatpuffer pH 6
- 2b) 0,1 m Phosphatpuffer pH 6
- 2c) 0,25 m Phosphatpuffer pH 6
- 3a) 0,05 m Phosphatpuffer pH 9
- 3b) 0,1 m Phosphatpuffer pH 9
- 3c) 0,25 m Phosphatpuffer pH 9
- 4) 0,05 n Natronlauge
- 5) 0,1 n Natronlauge
- 6) 0,25 n Natronlauge

Höhere Natronlaugekonzentrationen können nicht verwendet werden, da nach den Erfahrungen von H. NEUKOM et al. (98) das Säulenmaterial unter solchen Bedingungen Cellulosefragmente abgibt. Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muß sogar angenommen werden, daß schon 0,25 n Natronlauge als Elutionsflüssigkeit Säulenmaterial ablöst.

Zur Bestimmung der Polysaccharide im Eluat mußte wegen der großen Zahl der zu untersuchenden Proben und den zum Teil sehr geringen Polysaccharidkonzentrationen eine rationelle und gleichzeitig empfindliche Bestimmungsmethode gewählt werden. Es kam daher nur eine

kolorimetrische Methode in Frage, und unter diesen wurde die Phenol-Schwefelsäure-Methode nach M. DUBOIS et al. (106) ausgewählt, da sie vor anderen kolorimetrischen Methoden erhebliche Vorteile aufweist. Die Vorteile bestehen, gegenüber anderen Methoden, darin, daß mit dieser Methode schon nach kurzer Zeit eine für mehrere Stunden konstante Farbtintensität erreicht wird, und daß die Adsorptionsmaxima für die einzelnen Bausteintypen, Hexosen, Pentosen, Uronsäuren, nur einen Lageunterschied von 10 m μ aufweisen, was bei einem so heterogenen Material wie einem Pflanzenschleim sehr wichtig ist.

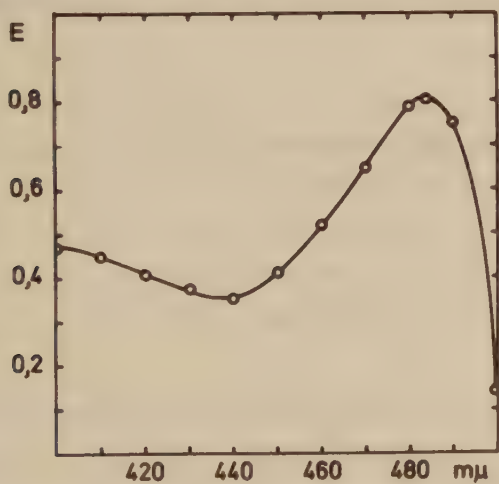


Fig. 5 Absorptionskurve von Rohschleimlösung
(500 μ g/1 ml) mit Phenol-H₂SO₄-Reagenz.

Während die Absorptionsmaxima für Pentosen und Uron-säuren bei 480 m μ und für Hexosen bei 490 m μ liegen, lag das des Rohschleims bei 484 m μ (Fig. 5). Während der Elution veränderte sich die Lage der Maxima von 487 m μ bei den neutralen Polysacchariden nach 482 m μ bei den sauren Polysacchariden. Die Absorptionsunter-schiede bei den einzelnen Maxima waren jedoch so ge-ringfügig, daß alle Proben bei dem Absorptionsmaximum des Rohschleims bei 484 m μ gemessen wurden.

Die Eluate wurden mit einem Fraktionensammler in Proben zu 15 ml gesammelt und hierin der Gehalt an Polysacchari-den mittels der oben beschriebenen Methode bestimmt. Nach diesen Ergebnissen wurde eine Elutionskurve auf-gestellt (Fig. 6).

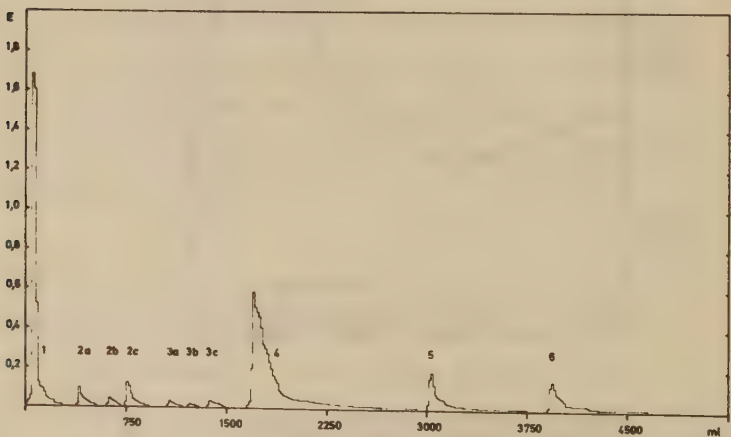


Fig. 6 Elutionskurve von 100 mg Rohschleim unter Verwen-dung der auf Seite 48 angegebenen Elutionsmittel.

Wie aus dieser Elutionskurve ersichtlich, konnte der Hexeneischleim mittels der Chromatographie an DEAE-Cellulose in zehn Polysaccharid-Fractionen zerlegt werden, deren Anteile an dem Schleim jedoch sehr verschieden waren.

Die Fractionen 2a - 3c enthielten nur sehr geringe Polysaccharid-Mengen, so daß es wenig sinnvoll erschien, diese, wie oben beschrieben, auch im weiteren Verlauf der Arbeit nach steigender Elektrolytkonzentration getrennt aufzufangen, zumal angenommen werden muß, daß diese Fractionen auf Grund der Molekulargewichtsverteilung zustande kommen.

So wurden bei weiteren Fractionierungen nur noch folgende Lösungen als Elutionsmittel eingesetzt:

- 1) Wasser
- 2) 0,25 m Phosphatpuffer pH 6
- 3) 0,25 m Phosphatpuffer pH 9
- 4) 0,05 n Natronlauge
- 5) 0,1 n Natronlauge
- 6) 0,25 n Natronlauge

Die Verwendung dieser Elutionsmittel ergibt die aus Fig. 7 ersichtliche Fractionierung.

Unangenehm machte sich die lange Schwanzbildung der einzelnen Fractionen bemerkbar, besonders bei der Auftrennung der Polysaccharid-Fractionen in präparativen Maßstab.

Diese Schwanzbildung wurde schon an anderer Stelle bei der Chromatographie von Polynucleotiden an DEAE-Cellulose beobachtet (107). Diese Autoren schreiben die Schwanzbildung sekundären Bindungskräften, wie Wasserstoffbrücken zwischen Substrat und Säulen-

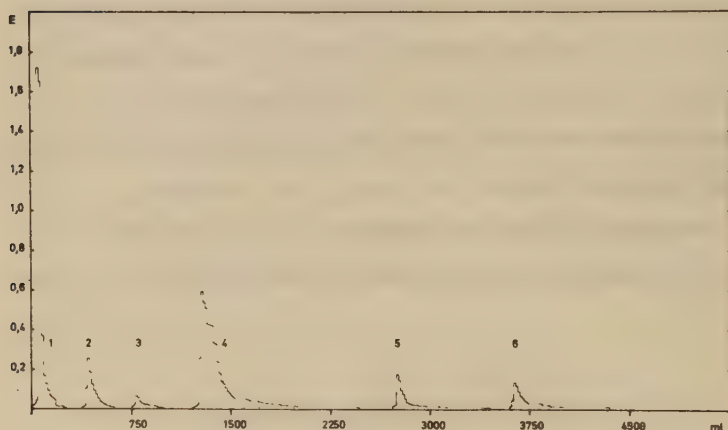


Fig. 7 Elutionskurve von 100 mg Rohschleim unter Verwendung der auf Seite 51 angegebenen Elutionsmittel.

material zu. Sie verbesserten die Trennung ihrer Fraktionen durch Ausschaltung solcher Kräfte durch Zugabe von 7 Molen Harnstoff zu den Elutionslösungen. D.A.APPLEGARTH und G.G.DUTTON (108) machten von dieser Möglichkeit erstmals auf dem Gebiet der Polysaccharidanalytik mit Erfolg Gebrauch.

Bei der Auftrennung des Hexeneischleimes brachte diese Methode keine nennenswerte Verbesserung der Trennung, so daß sie sich auch bei weiteren Fraktionierungen erübrigte.

Die in Fig. 6 und 7 abgebildeten Elutionskurven müssen kritisch betrachtet werden. Sie lassen nur eine grobe Orientierung bezüglich der mengenmäßigen Verteilung der einzelnen Fraktionen zu. Die Zusammensetzung der Fraktionen ist, wie bei Pflanzenschleimen allgemein, sehr komplex. Sie enthalten, wie später noch gezeigt werden wird, Pentosen, Methylpentosen, Hexosen und Hexuronsäure. Die kolorimetrischen Bestimmungsmethoden weisen bei der Bestimmung der verschiedenen Zucker beziehungsweise Uronsäuren zum Teil erhebliche Unterschiede in der Lage der Absorptionsmaxima und in der Extinktion auf. Analog gilt dies auch für die Polymeren dieser Zucker. Dies ist zwar bei der hier verwendeten Methode nicht in dem Ausmaß der Fall, wie bei anderen, beispielsweise der Anthron-Methode, dennoch besteht die Gefahr einer erheblichen Fehlinterpretation, wollte man die durch kolorimetrische Messung erhaltenen Elutionskurven zu einer quantitativen Beurteilung der Zusammensetzung des Hexeneischleimes heranziehen. Es wurde auf die Erstellung einer Eichkurve aus dem Gesamtschleim, wie es H. NEUKOM et al. (98) beschrieben haben, verzichtet und statt dessen die quanti-

tative Zusammensetzung des Schleimes aus den einzelnen Fraktionen auf Grund der gewogenen Ausbeuten der präparativen Isolierung vorgenommen.

Zur präparativen Isolierung der einzelnen Polysaccharid-Fractionen wurden bei Verwendung von 300 g DEAE-Cellulose 3 g Rohschleim eingesetzt. Die Stufenelution erfolgte analog der analytischen Trennung mit

- 1) Wasser
- 2) 0,25 m Phosphatpuffer pH 6
- 3) 0,25 m Phosphatpuffer pH 9
- 4) 0,05 n Natronlauge
- 5) 0,1 n Natronlauge
- 6) 0,25 n Natronlauge

Es wurde mit jedem Lösungsmittel gespült, bis im abtropfenden Eluat keine Kohlenhydrate mehr nachzuweisen waren. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen schonend eingeengt, mittels Ionenaustauschern und Dialyse entmineralisiert und zum Schluß lyophilisiert.

Die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen waren

1) Wassereluat	250 mg	=	12,1 %
2) pH 6-Eluat	350 mg	=	17,0 %
3) pH 9-Eluat	60 mg	=	2,9 %
4) 0,05 n-NaOH-Eluat	1100 mg	=	53,4 %
5) 0,1 n-NaOH-Eluat	190 mg	=	9,2 %
6) 0,25 n-NaOH-Eluat	110 mg	=	5,3 %
	2060 mg		99,9 %
	=====		=====

Die Gesamtausbeute an Polysacchariden stimmte in etwa mit dem Polysaccharid-Anteil an dem Rohschleim von 66 % überein. Die so aufgearbeiteten Fraktionen waren aschefrei, sie enthielten im Gegensatz zum Rohschleim weder Stickstoff noch Schwefel.

Diese Fraktionierungsmethode hat sich damit nicht nur als sehr wirkungsvoll, sondern auch als rationell erwiesen, da auf eine Vorreinigung des Rohschleimes verzichtet werden konnte.

G. Qualitative Bausteinanalyse der Schleimfraktionen

Um die Zusammensetzung der Schleimfraktionen aus Zuckerbausteinen untersuchen zu können, war es erforderlich, diese Fraktionen zu hydrolysieren. Es wurden daher zunächst die günstigsten Hydrolysebedingungen ermittelt. Die Verschiedenheit der natürlich vorkommenden Polysaccharide bezüglich ihrer Zusammensetzung aus Monosaccharidbausteinen und die unterschiedliche Säureempfindlichkeit der verschiedenen glykosidischen Bindungen schließt eine für alle Polysaccharide anwendbare Methode zur Total-Hydrolyse aus. Furanosid-Bindungen sind säureempfindlicher als Pyranosid-Bindungen, alpha-glykosidische Bindungen sind säureempfindlicher als beta-glykosidische. Sehr schwierig gestaltet sich die Totalhydrolyse, wenn im Polysaccharidmolekül Uronsäuren vorkommen. Diese Uronsäuren sind mit neutralen Monosacchariden durch eine sehr säurebeständige glykosidische Bindung verknüpft und erschweren so die vollständige Hydrolyse des Polysaccharides, wenn sie sie nicht sogar unmöglich machen.

Die saure Reaktion des gereinigten Gesamtschleimes wies darauf hin, daß Uronsäuren im Hexeneischleim enthalten sein mußten. Eine Hydrolyse mit geringer Säurekonzentration, die man wegen der Gefahr eines Abbaues der Zuckerbausteine anstrebt, - nach G. JAYME und H. KNOLLE (109) muß selbst bei schonendster Hydrolyse mit einem

mittleren Verlust von 4 % Hexosen und 10 % Pentosen gerechnet werden - war daher nicht möglich. Aber auch einer Hydrolyse mit höherer Säurekonzentration sind enge Grenzen gesetzt. Zum einen werden die Uronsäuren bei höherer Säurekonzentration decarboxyliert; hierauf wurde eine Methode zur Bestimmung des Carboxylgehaltes von uronsäurehaltigem Material aufgebaut (110), zum anderen wurde im vorliegenden Falle schon bei Verwendung von 2 n Schwefelsäure gleich bei Zugabe der Säure zur Schleimlösung ein erheblicher Teil der Polysaccharide ausgefällt, was die Hydrolysierbarkeit dieses Schleimanteiles zumindest verzögerte.

Es wurde zwar keine Möglichkeit gefunden, diese Fällung gänzlich zu umgehen - auch mit Ameisensäure trat diese auf - aber bei Verwendung von 1 n Schwefelsäure konnte die gleich zu Beginn der Hydrolyse auftretende Fällung verhindert werden, sie erschien erst etwa nach einer Stunde Erhitzens und war feinflockiger, als bei Verwendung von 2 n Schwefelsäure. Zur Feststellung der günstigsten Hydrolysedauer wurde eine Lösung von gereinigtem Gesamtschleim mit 1 n Schwefelsäure 21 Stunden bei 100° C hydrolysiert. In bestimmten Zeitabständen wurde dem Hydrolysat eine Probe entnommen und die Zunahme der Reduktionskraft nach der 3,5-Dinitrosalicylsäure-Methode von K. H. MEYER et al. (111) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Tab. 3 zusammengestellt und danach eine Hydrolysekurve gezeichnet (Fig. 8).

In derselben Weise wurde auch für die beiden Neutralfraktionen 1 und 2 die günstigste Hydrolysedauer ermit-

telt. Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen 4 und 5, die danach gezeichneten Hydrolysekurven unter Fig. 9 u. 10.

Tab. 3

Werte zur Hydrolysekurve von gereinigtem Gesamtschleim

<u>Stunden</u>	<u>Extinktion</u>
0	0,06
1,5	0,37
3	0,56
6	0,72
9	0,77
12	0,8
15	0,81
21	0,71

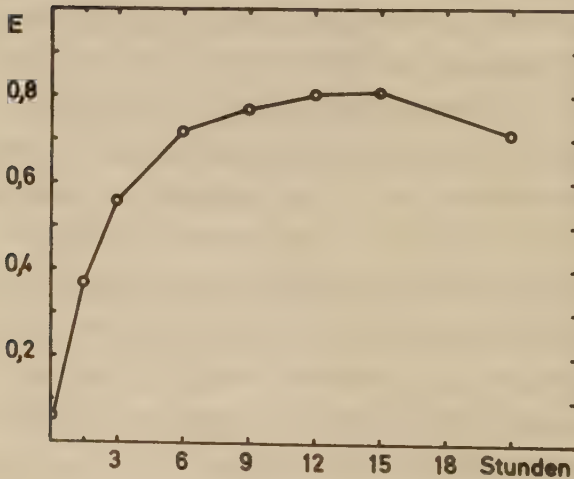


Fig. 8 Hydrolysekurve von gereinigtem Gesamtschleim

Tab. 4

Werte zur Hydrolysekurve von Schleimfraktion 1

<u>Stunden</u>	<u>Extinktion</u>
0	0,02
0,5	0,34
1	0,508
1,5	0,595
2	0,65
3	0,684
4	0,689
5	0,69

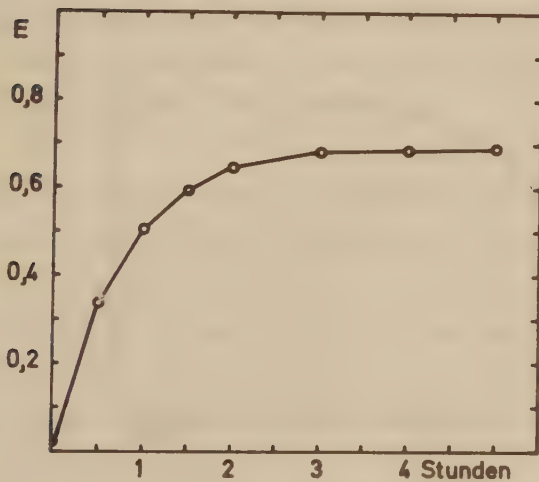


Fig. 9 Hydrolysekurve von Schleimfraktion 1

Tab. 5

Werte zur Hydrolysekurve von Schleimfraktion 2

<u>Stunden</u>	<u>Extinktion</u>
0	0,04
0,5	0,37
1	0,535
1,5	0,61
2	0,66
3	0,695
4	0,695
5	0,7

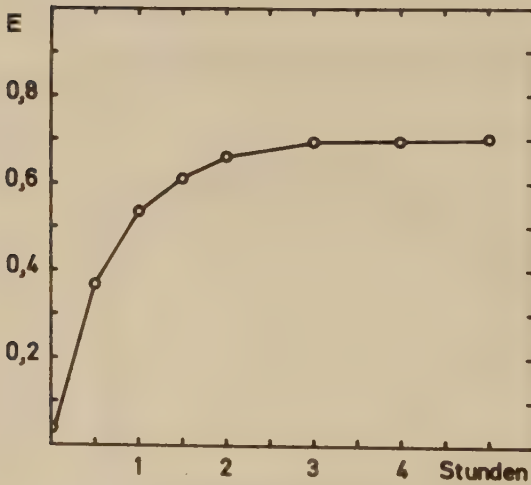


Fig. 10 Hydrolysekurve von Schleimfraktion 2

Diese Ergebnisse zeigen, daß in den sauren Polysacchariden des Hexeneischleimes nach 12-stündiger Hydrolyse eine maximale Spaltung erfolgt ist. Bei weiterer Hydrolyse hält sich für einige Stunden ein Gleichgewicht zwischen freiwerdenden Bausteinen und Abbau von schon abgespaltenen Zuckern, bis schließlich nach 21 Stunden der Abbau der freien Monosaccharide überwiegt, und es zu einem Abfall der Reduktionskraft kommt.

Im Gegensatz dazu wurden die neutralen Polysaccharide des Hexeneischleimes schon nach 3 Stunden maximal gespalten. Ein nennenswerter Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber der sauren Hydrolyse unter den beschriebenen Bedingungen zwischen den beiden neutralen Fraktionen war nicht zu erkennen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden alle sauren Fraktionen und der Gesamtschleim 12 Stunden, die neutralen Fraktionen 3 Stunden mit 1 n Schwefelsäure hydrolysiert.

Um die Hydrolysate mit chromatographischen Methoden auf ihre Zusammensetzung untersuchen zu können, wurde die hierbei störende Schwefelsäure durch Ausfällen mit Bariumhydroxid entfernt. Die entsalzten Hydrolysate wurden mittels Anionenaustauscher in neutrale und saure Anteile zerlegt und diese einer getrennten Untersuchung zugeführt.

Zur Identifizierung der neutralen Monosaccharide wurden verschiedene Methoden ausprobiert, so die Elektrophorese an Papier in 0,05 m Boraxlösung (112), die Dünnschichtchromatographie an phosphatgepufferten Kieselgur-G-Schichten (113) und die Dünnschichtchromatographie an Celluloseschichten (114). Die besten Ergebnisse wurden jedoch mittels der Papierchromatographie mit dem Laufmittel n-Butanol:Pyridin:Wasser (10:3:3) von E.CHARGAFF et al. (115) in der Durchlauftechnik erzielt.

Als Sprühmittel wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Reagenzien ausprobiert: Anilinphthalat-Reagenz (116), p-Anisidin-Salzsäure-Reagenz (117), p-Anisidin-Phthalsäure-Reagenz (114) und p-Aminobenzoesäure-Oxalsäure-Reagenz (118). Die Ergebnisse waren mit allen Reagenzien gleichermaßen befriedigend. Es wurde dem seit langem bewährten Anilinphthalat-Reagenz der Vorzug gegeben.

Im Vergleich mit authentischem Material konnten im Hydrolysat des Gesamtschleimes sowie der Fraktion 1 folgende neutrale Monosaccharide erkannt werden:

Galaktose, Glucose, Mannose, Xylose und Fucose.

In den Hydrolysaten der Fraktionen 2 - 6 fanden sich die gleichen Neutralzucker mit Ausnahme der Fucose (Fig. 11). Der Mannosefleck und der Fructosefleck lagen unter den beschriebenen Bedingungen auf dem Papierchromatogramm dicht beieinander. Um eindeutig

ausschließen zu können, daß es sich bei diesem Fleck nicht um Fructose handelte, wurde ein weiteres Chromatogramm mit Naphthoresorcin-Trichloressigsäure-Reagenz (119) besprüht, wobei sich der authentische Fructosefleck anfärben ließ, der Mannosefleck des Hydrolysates dagegen nicht.

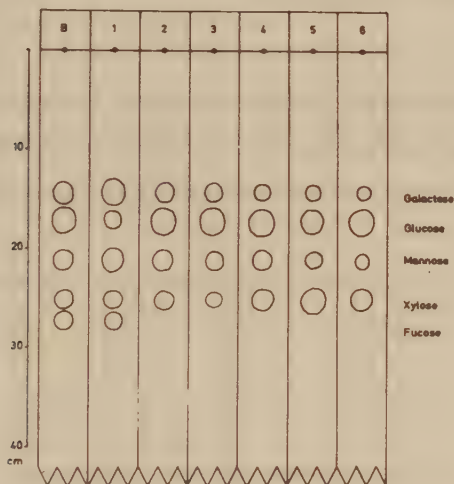


Fig. 11 Papierchromatogramm von den Neutralanteilen der Hydrolysate des Gesamtschleimes (B) und der Fraktionen 1-6, Laufmittel n-Butanol : Pyridin : Wasser (10:3:3), Laufzeit 72 Std. Sprühreagenz: Anilinphthalat

Zur Untersuchung der sauren Bestandteile der Hydrolysate wurde die Elektrophorese herangezogen.

Nach den Erfahrungen von A. HAUG und B. LARSEN (120) kann Glucuronsäure sowohl in sauren als auch in alka-

lischen Puffern elektrophoretisch von den anderen Uronsäuren getrennt und identifiziert werden. Bei Verwendung von alkalischen Puffern ist jedoch ein geringer Zusatz von Calciumchlorid notwendig. Die verschiedenen Uronsäuren zeigen eine unterschiedliche Bereitschaft Calciumkomplexe zu bilden, wodurch die elektrophoretische Trennung verbessert wird.

Im vorliegenden Falle wurde mit saurem Puffer (pH 3,5) gearbeitet und im Vergleich mit authentischem Material die Uronsäure des Hexeneischleimes als Glucuronsäure erkannt (Fig. 12).

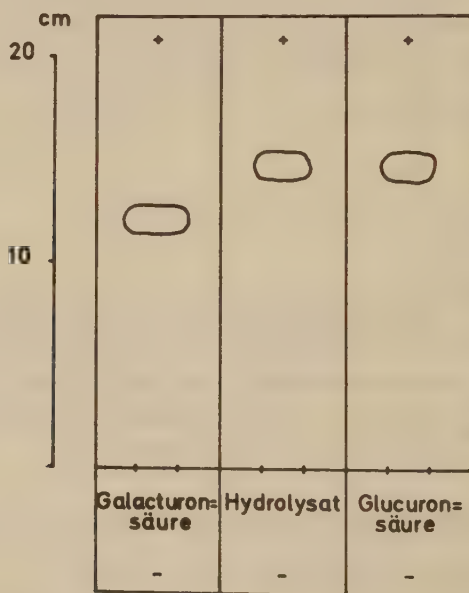


Fig. 12 Elektropherogramm des Hydrolysates des Hexeneischleimes in saurem Puffer (pH 3,5), 1150 V Spannung, Laufzeit 3,5 Stunden. Sprühreagenz: Anilinphtalat.

In der folgenden Tab. 6 sind die ermittelten Bausteine des Gesamtschleimes sowie der Schleimfraktionen zu einer Übersicht zusammengestellt.

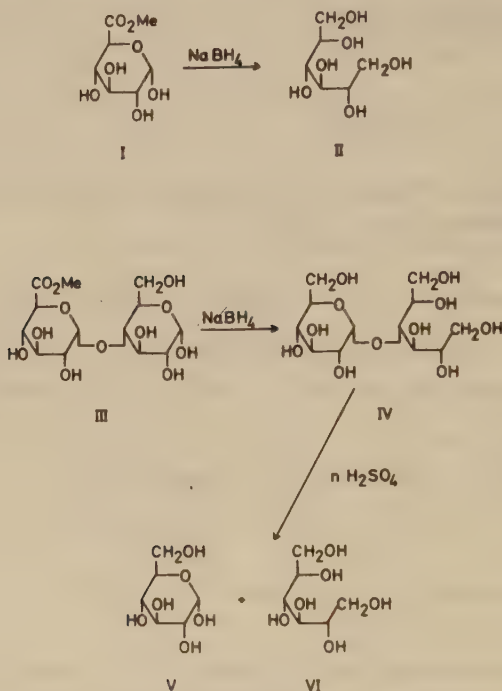
Tab. 6

Fraktion Nr.	Glucuronsäure	Galactose	Glucose	Mannose	Xylose	Fucose
1	-	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	-
Gesamt- schleim	+	+	+	+	+	+

Um die Zusammensetzung der im sauren Anteil des Schleimhydrolysates vorhandenen hydrolysebeständigen sog. Alduronssäuren zu ermitteln, wurde, nach vorheriger Veresterung mit Diazomethan, mit Natriumborhydrid reduziert und anschließend wieder hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde dünnschichtchromatographisch (113) und papierchromatographisch (121) untersucht. Es wurde viel Sorbit neben wenig Glucose gefunden.

Dieses Ergebnis zeigte, daß es sich bei der Uronsäure des Hexeneischleimes wirklich, wie schon elektrophoretisch

ermittelt, um Glucuronsäure (I) handelt: sie wurde bei der Reduktion zu Sorbit (II) umgesetzt.



Die hier eingezeichnete α -1:4-glykosidische Verknüpfung wurde nicht bewiesen; dies ist jedoch für den vorliegenden Fall unerheblich.

Die Anwesenheit von wenig Glucose bewies, daß ein geringer Anteil der Glucuronsäure nicht frei, sondern als Alduronsäure (III) gebunden, im Hydrolysat des Hexeneischleimes vorlag. Dieser Anteil konnte daher nur zur Glucose reduziert werden (IV,V). Der Neutralzucker, mit dem die Glucuronsäure zur Alduronsäure verbunden war, mußte Glucose sein,

sonst wäre nach der Hydrolyse des reduzierten Materials ein anderer Zuckeralkohol als Sorbit freigesetzt worden(IV,VI).

Die Anwesenheit dieser Alduronsäure im Hydrolysat lieferte einen Hinweis auf die Feinstruktur des Schleimes, es mußten in den Polysaccharidmolekülen Glucuronsäure-Glucose-Bausteine vorhanden sein.

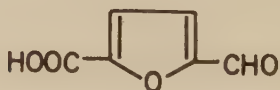
Das Vorkommen solcher Bausteine in den Polysacchariden des Hexeneischleimes wurde noch durch ein anderes Untersuchungsergebnis bestätigt.

Wie schon erwähnt, fiel beim Hydrolysieren des Schleimes mit 1 n Schwefelsäure ein gewisser Anteil Polysaccharide aus. Diese Polysaccharidfällung wurde bei der Aufarbeitung des Hydrolysates abgetrennt, mittels Ionenaustauschern und Dialyse gereinigt und wieder, aber diesmal mit 2 n Schwefelsäure, hydrolysiert. Dieses Hydrolysat wurde, wie auch die anderen papierchromatographisch und elektrophoretisch untersucht. Dabei wurden als einzige Bestandteile viel Glucuronsäure neben wenig Glucose gefunden.

H. Quantitative Bausteinanalyse der Schleimfraktionen

Schon beim qualitativen Nachweis der einzelnen Fraktionen des Hexeneischleimes während der Fraktionierung fiel auf, daß der Gesamtschleim und die Fraktionen 1, 2, 3 und 6 mit Anthron-Reagenz (122) eine blaugrüne Farbe, die Fraktion 4 jedoch eine rote und die Fraktion 5 eine purpurne ergaben. Aus den Arbeiten von H.NEUKOM und P.HUI (123) sowie den Arbeiten von J.R.HELBERT und K.D.BROWN (124, 125) ist bekannt, daß Uronsäuren und deren Polymere mit dem Dreywoodschen Anthron-Reagenz, im Gegensatz zu den Hexosen und Pentosen, die eine blaugrüne Farbe ergeben, unter den gleichen Bedingungen eine Rotfärbung zeigen.

Diese rote Farbe beruht auf der intermediären Bildung von 2-Formyl-5-carboxy-furan



und dessen Reaktion mit Anthron in stark schwefelsaurem Milieu (123).

Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Fraktionen um Polysaccharide handelte, die einen sehr hohen Glucuronsäure-Anteil enthielten.

Auf Grund eigener Versuche mit Glucose-Glucuronsäure-Gemischen konnte festgestellt werden, daß, je nach Reaktionsbedingungen und Konzentration der Kohlenhydrate, in Gemischen mit 70 - 80 % Glucuronsäure mit dem Anthron-Reagenz schon eine deutliche Rotfärbung zu erkennen war.

Zur Bestimmung des Glucuronsäure-Anteils der Schleimfraktionen wurde die Titrationsmethode (126) und die Carbazol-Schwefelsäure-Methode (127, 128) herangezogen.

Zunächst wurde nach der Titrationsmethode der Anteil der unveresterten Glucuronsäure an den Polysaccharidfraktionen bestimmt. Dazu wurden die genau gewogenen sauren Polysaccharide in jeweils 10 ml 0,01 n Natronlauge gelöst und mit 0,01 n Salzsäure gegen Phenolphthalein als Indikator zurücktitriert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengestellt.

Tab. 7

Ergebnisse der Titration der unveresterten Glucuronsäure im Gesamtschleim und in den Fraktionen 3 - 6.

Fraktion Nr.	Einwaage mg	Verbrauch ml 0,01 n NaOH	Anteil unveresteter Glucuronsäure in %
3	44,7	0,48	1,87
4	12,3 81,8	0,7 4,4	9,9 9,35
5	11,3 57,8	1,24 6,2	19,05 18,8
6	12,8	2,98	40,5

Der Faktor der Natronlauge wurde mit 0,988 ermittelt.

Der Berechnung wurde das Molekulargewicht der Anhydroglucuronsäure mit 176 zu Grunde gelegt.

Als nächstes wurde die Gesamtglucuronsäure der einzelnen Fraktionen mittels Titration bestimmt.

Dazu wurden die Polysaccharide in jeweils 10 ml 0,01 n Natronlauge gelöst und zur Verseifung der Uronsäure-ester 30 Minuten bei 60° C im Thermostaten erhitzt.

Dann wurde mit 0,01 n Salzsäure gegen Phenolphthalein als Indikator zurücktitriert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 8 zusammengestellt.

Tab. 8

Ergebnisse der Titration der Gesamtglucuronsäure
im Gesamtschleim und in den Fraktionen 3 - 6.

Fraktion Nr.	Einwaage mg	Verbrauch ml		Anteil an Glu- curonsäure in %
		0,01	NaOH	
3	19,2	3,12		27,1
	16,4	2,48		25,3
	17,1	2,68		26,1
4	13,6	6,86		84,2
	13,2	6,94		87,7
	12,7	6,8		89,3
5	12,7	5,38		70,8
	13,6	6,14		75,3
	13,7	6,1		74,4
6	17,6	5,18		49,2
	14,4	4,2		48,6
Gesamt- schleim	12,7	4,48		59,0
	17,4	5,98		57,0

Der Faktor der Natronlauge wurde mit 0,948 ermittelt.

Der Berechnung wurde das Molekulargewicht der Anhydro-
glucuronsäure mit 176 zu Grunde gelegt.

Zur Kontrolle der durch Titration erzielten Ergebnisse
wurde noch eine kolorimetrische Methode, die Carbazol-
Schwefelsäure-Methode, herangezogen.

Diese Methode beruht darauf, daß Glucuronsäure in stark
saurem Milieu unter Wasserabgabe zu 2-Formyl-5-carboxy-

furan abgebaut wird und diese Verbindung mit Carbazol unter Bildung eines purpurnen Farbstoffes reagiert.

Aus der Farbintensität kann anhand einer Eichkurve der Gehalt an Glucuronsäure bestimmt werden.

Die Werte zur Eichkurve sind in Tab. 9 zusammengestellt, die Eichkurve ist unter Fig. 12 abgebildet.

Die Glucuronsäuregehalte der Schleimfraktionen 3 - 6 sowie des Gesamtschleimes finden sich in Tab. 10.

Tab. 9

Werte zur Glucuronsäure-Eichkurve

Glucurons. ug	Extinktion
20	0,05
40	0,109
60	0,165
80	0,222
100	0,278

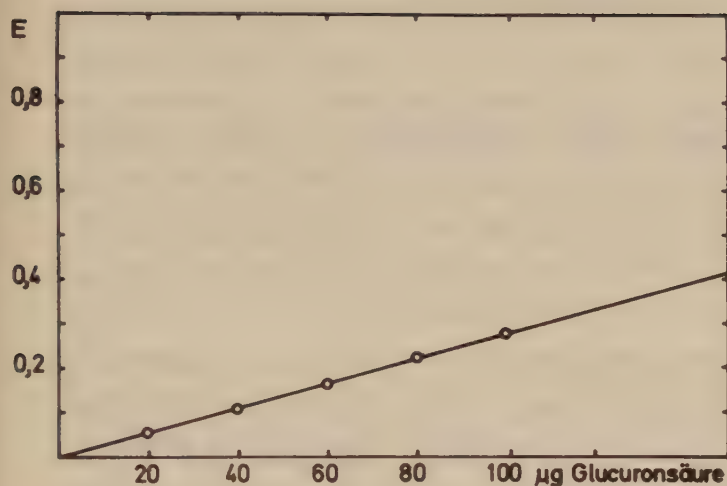


Fig. 12 Eichkurve zur Glucuronsäurebestimmung nach der Carbazol-Methode

Tab. 10

Ergebnisse der Glucuronsäurebestimmung nach der Carbazol-Methode

Fraktion Nr.	Einwaage µg	Extinktion	Gehalt an Glu- curonsäure in %
3	100	0,082	30,0
4	100	0,244	88,9
5	100	0,202	72,8
6	100	0,13	47,3
Gesamt- schleim	100	0,166	60,4

Die Werte zeigen eine befriedigende Übereinstimmung mit den titrierten Werten.

Im Gegensatz zur Glucuronsäure, die, ebenso wie die anderen Uronsäuren, direkt in Polysacchariden bestimmt werden kann, müssen die neutralen Monosaccharide zuvor auf eine geeignete Weise aus dem Polysaccharid isoliert werden, was natürlich die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigt. Die Polysaccharide werden zunächst hydrolysiert, und die Zuckerbausteine dann mit einer chromatographischen Methode getrennt. In der Literatur werden, außer der Verwendung verschiedener Reagenzien, prinzipiell drei verschiedene Möglichkeiten der Zuckerbestimmung nach chromatographischer Auftrennung eines Hydrolysates beschrieben.

1. Das Chromatogramm wird mit einem geeigneten Reagenz angefärbt und die Flecken auf dem Chromatogramm densitometrisch ausgemessen (109, 129).
2. Das Chromatogramm wird mit einem geeigneten Reagenz angefärbt, die angefärbten Zuckerflecken ausgeschnitten, aus dem Papier eluiert und kolorimetrisch bestimmt (130, 131).
3. Die Zuckerflecken werden mittels Leitchromatogrammen auf dem Chromatogramm lokalisiert, ausgeschnitten, aus dem Papier eluiert und der Zuckergehalt der Eluate mit einem geeigneten Reagenz kolorimetrisch bestimmt (106, 132 - 134).

Von den hier beschriebenen Methoden wird in der Literatur die letztgenannte am häufigsten angewandt.

Die Fehlerbreite jedoch, die bei all diesen Methoden mit mindestens 5 % angenommen werden muß, dürfte weniger in der Isolierungs- und Bestimmungsart ihre Hauptursache haben, als vielmehr in der Notwendigkeit, die zu untersuchenden Polysaccharide zu hydrolysieren, und dem damit verbundenen Verlust an Zuckern.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Versuch gemacht, nach der Methode von J. IMMERS (135) zu arbeiten, die eine Modifizierung des unter Nr. 3 genannten Weges darstellt, indem sie die papierchromatographische Trennung und die Extraktion der Zucker aus dem Papier in einem Arbeitsgang zusammenfaßt.

In einer thermostatierten Chromatographiekammer, an deren Unterseite ein Abflußhahn angebracht war, wurden die zu untersuchenden Zuckergemische nach der Durchlauftechnik mit dem Laufmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:4:1) absteigend chromatographiert. Ziel dieses Verfahrens war es, die Zucker bei dem Auslaufen aus dem Chromatogramm einzeln aufzufangen und zu bestimmen. Die Zeitdauer, nach der die einzelnen Zucker aus dem Chromatogramm ausliefen, war mit Test-Chromatogrammen zuvor ermittelt worden.

Jedoch wurde dieser Weg der Trennung und Bestimmung der Zuckergemische nicht weiterverfolgt, da sich

herausstellte, daß diese Methode wegen ihres großen Zeitbedarfs für Reihenuntersuchungen nicht geeignet war. Um eine ausreichende Anzahl von Vergleichswerten zu erhalten, wäre, um diese Methode vom Zeitaufwand her rentabel zu gestalten, eine große Zahl dieser speziell herzustellenden Chromatographiekammern notwendig gewesen, und für diesen Aufwand schien die Methode keine ausreichenden Vorteile zu bieten.

So wurden im Folgenden die Schleimhydrolysate wie unter Nr. 3 beschrieben untersucht. Die Zucker wurden wie bei der qualitativen Bausteinanalyse papierchromatographisch getrennt, mit Leitchromatogrammen auf den Chromatogrammen lokalisiert und nach Ausschneiden und Eluieren aus dem Papier mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode bestimmt (Tab. 12). Zu diesem Zweck mußten von den einzelnen zu bestimmenden Zuckern Eichkurven aufgestellt werden. Die Werte zu diesen Eichkurven sind in Tab. 11 zusammengestellt, die danach gezeichneten Eichkurven sind unter Fig. 13, 15, 17, 19 und 21 abgebildet. Unter Fig. 14, 16, 18, 20 und 22 finden sich die Absorptionskurven der einzelnen Zucker-Reagenzlösungen.

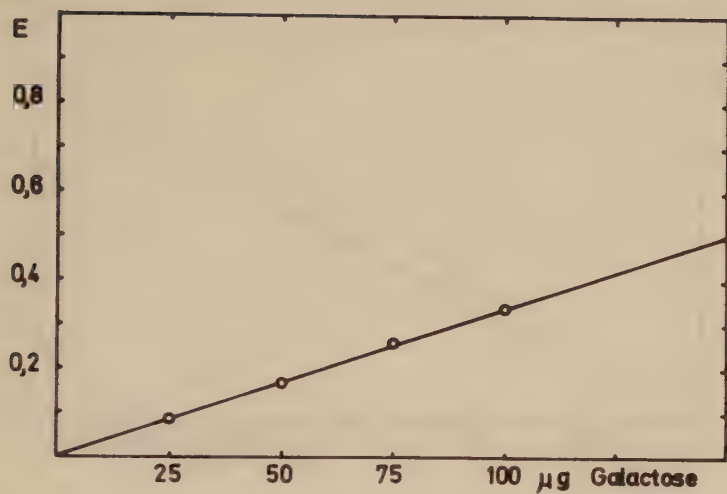


Fig. 13 Eichkurve f. Galactosebest. nach Phenol- H_2SO_4 -Methode

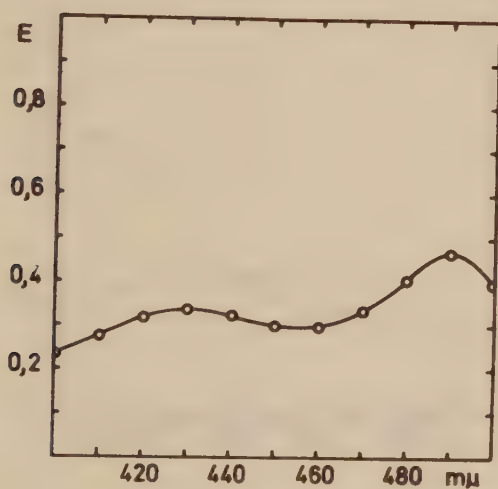


Fig. 14 Absorptionskurve von 100 µg Galactose in 7 ml Reag.

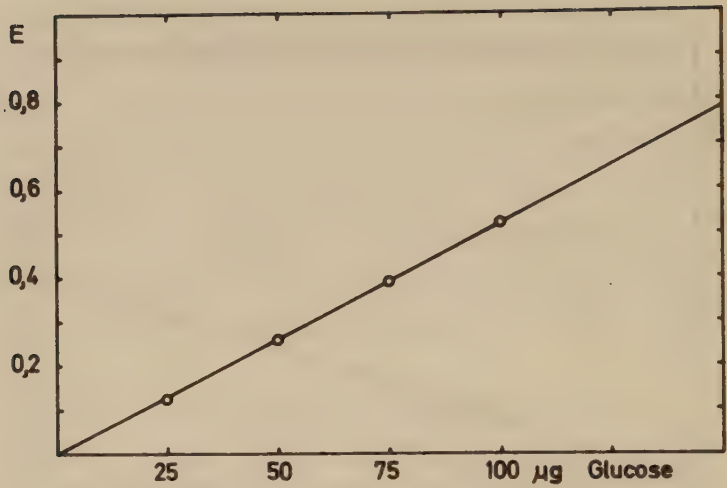


Fig. 15 Eichkurve f. Glucosebest. nach Phenol- H_2SO_4 -Methode

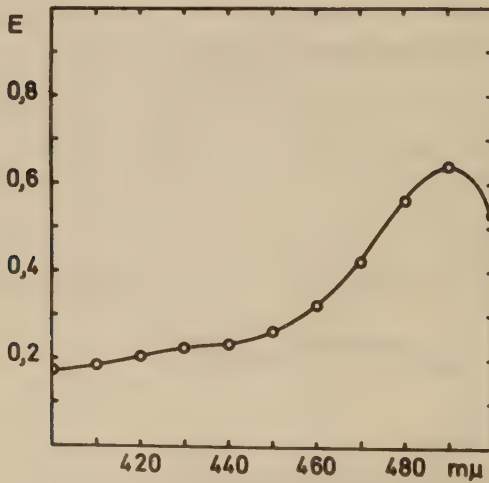


Fig. 16 Absorptionskurve von 100 µg Glucose in 7 ml Reag.

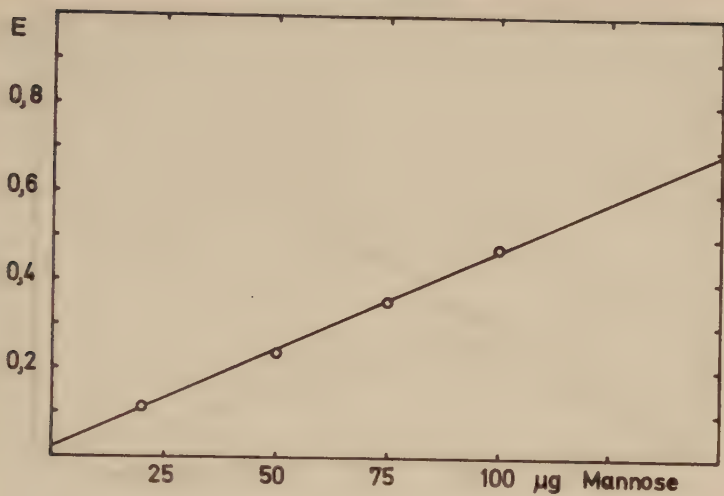


Fig. 17 Eichkurve f. Mannosebest. nach Phenol- H_2SO_4 -Methode

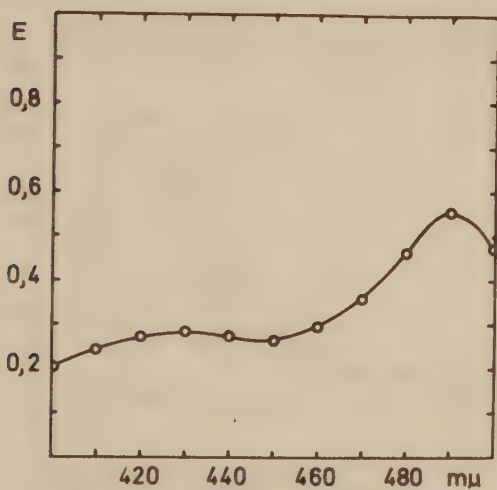


Fig. 18 Absorptionskurve von 100 µg Mannose in 7 ml Reag.

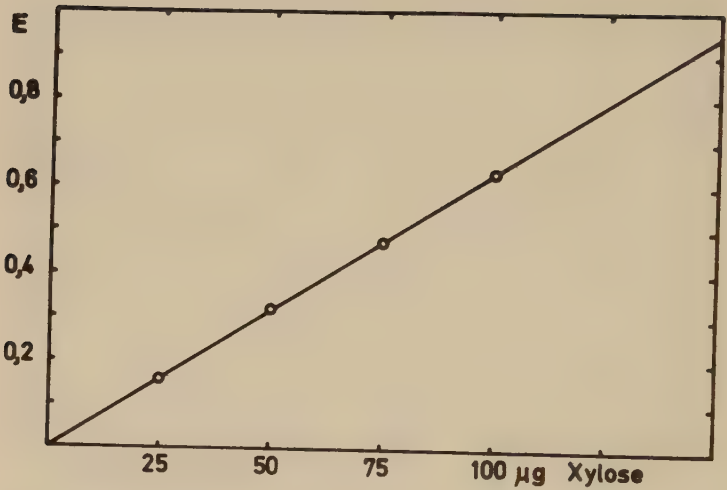


Fig. 19 Eichkurve f. Xylosebest. nach Phenol- H_2SO_4 -Methode

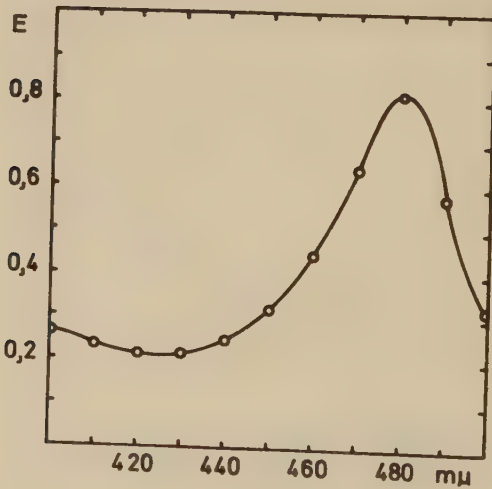


Fig. 20 Absorptionskurve von 100 μg Xylose in 7 ml Reag.

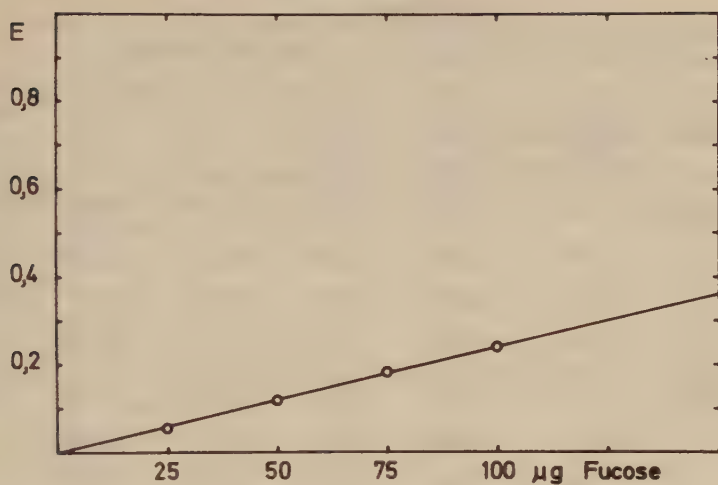


Fig. 21 Eichkurve f. Fucosebest. nach Phenol- H_2SO_4 -Methode

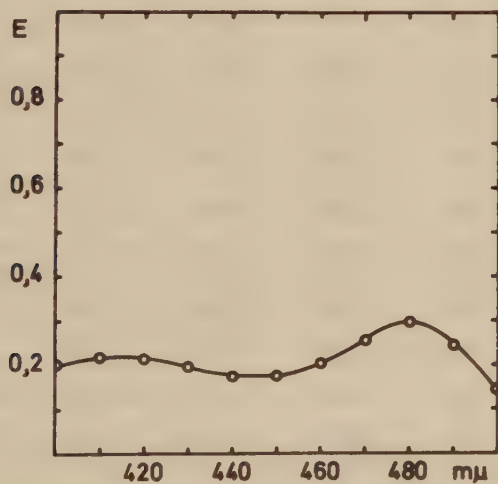


Fig. 22 Absorptionskurve von 100 μg Fucose in 7 ml Reag.

Tab. 11

Werte zu den Eichkurven für die versch. Zucker

Zucker	Einwaage µg	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E
Galactose	25	0,092	0,09	0,086	0,09	0,089
	50	0,167	0,174	0,172	0,168	0,17
	75	0,26	0,26	0,26		0,26
	100	0,333	0,339	0,335	0,338	0,336
Glucose	25	0,13	0,13	0,124	0,128	0,128
	50	0,268	0,263	0,252	0,258	0,26
	75	0,384	0,39	0,393	0,393	0,39
	100	0,528	0,52	0,521		0,523
Mannose	25	0,114	0,119	0,12	0,115	0,117
	50	0,24	0,241	0,236	0,234	0,238
	75	0,356	0,355	0,354		0,355
	100	0,48	0,476	0,474	0,474	0,476
Xylose	25	0,16	0,16	0,16		0,16
	50	0,324	0,321	0,318	0,318	0,32
	75	0,479	0,48	0,47	0,471	0,475
	100	0,632	0,632	0,631	0,63	0,631
Fucose	25	0,06	0,054	0,054		0,056
	50	0,115	0,122	0,120		0,119
	75	0,18	0,18	0,183		0,181
	100	0,237	0,241	0,242		0,24

Tab. 12

Ergebnisse der quantitativen Neutralzucker-Bestimmung

Fraktion Nr.	Zucker	E	Gehalt im Zuckeran- teil des Hydrolysa- tes in µg	Gehalt im Zuckeran- teil des Hydrolysa- tes in %	Gehalt im Gesamthydro- lysat der Fraktion in %	Gehalt im Gesamt- schleim in %
1	Galactose	0,91	271	54,1	54,1	6,55
	Glucose	0,204	39	7,8	7,8	0,94
	Mannose	0,679	143	28,5	28,5	3,45
	Xylose	0,163	25	5,0	5,0	0,6
	Fucose	0,051	23	4,6	4,6	0,56
2	Galactose	0,091	26	15,4	15,4	2,62
	Glucose	0,53	101	59,7	59,7	10,15
	Mannose	0,122	26	15,4	15,4	2,62
	Xylose	0,105	16	9,5	9,5	1,61
3	Galactose	0,211	62	16,3	11,4	0,33
	Glucose	0,96	286	75,0	52,5	1,51
	Mannose	0,106	23	6,4	4,5	0,13
	Xylose	0,062	10	2,6	1,8	0,05
4	Galactose	0,026	7	4,2	0,5	0,25
	Glucose	0,602	115	69,3	7,7	4,1
	Mannose	0,064	14	8,4	0,9	0,5
	Xylose	0,192	30	18,1	2,0	1,07
5	Galactose	0,014	4	2,4	0,7	0,06
	Glucose	0,328	63	38,2	10,4	0,96
	Mannose	0,043	9	5,5	1,5	0,14
	Xylose	0,559	89	54,0	14,7	1,35
6	Galactose	0,016	4	2,1	1,1	0,06
	Glucose	0,61	117	60,8	32,1	1,7
	Mannose	0,028	6	3,2	1,7	0,09
	Xylose	0,41	65	33,8	17,8	0,94

Tab. 12

Ergebnisse der quantitativen Neutralzucker-Bestimmung

Zucker		E	Gehalt im Zuckeran- teil des Hydrolysa- tes in µg	Gehalt im Zuckeran- teil des Hydrolysa- tes in %	Gehalt im Gesamt- schleim in %	Gehalt im Gesamtschleim in % addiert aus Zucker- fraktionen 1-6
Gerei- nigter Gesamt schleim	Galactose	0,149	44	17,7	7,05	9,87
	Glucose	0,675	129	51,8	20,5	19,36
	Mannose	0,173	36	14,5	5,75	6,93
	Xylose	0,205	32	12,9	5,1	5,62
	Fucose	0,018	8	3,2	1,2	0,56

I. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Polysacchariden können im allgemeinen physikalische und chemische Methoden herangezogen werden.

Als physikalische Methoden werden vor allem die Kryoskopie, die verschiedenen Formen der Osmometrie und die Molekulargewichtsbestimmung mittels Ultrazentrifuge eingesetzt. Die Anwendung der Kryoskopie und der Osmometrie ist jedoch problematisch, wenn unveresterte Uronsäurebausteine und damit dissoziationsfähige Gruppen in den Polysaccharidmolekülen enthalten sind. Unter Umständen kann die Anwesenheit von unveresterten Uronsäuren auch bei der Bestimmung mit der Ultrazentrifuge durch Assoziatbildung zu Fehlergebnissen führen.

Es wurde in dieser Arbeit versucht, die sauren Polysaccharidfraktionen, nach Veresterung mit Diazomethan, mit Natriumborhydrid zu reduzieren und dann das Molekulargewicht kryoskopisch zu bestimmen, aber selbst nach dreimaliger Wiederholung der Veresterung mit anschließender Reduktion waren noch Uronsäuren in den Polysacchariden nachweisbar. Die kryoskopisch ermittelten Werte fielen daher zu niedrig aus.

Da die Reduktion und die nachfolgende Isolierung des Polysaccharidmaterials durch Fällern in Aethanol mit einem gewissen Verlust an Analysenmaterial verbunden ist, war eine häufigere Wiederholung dieser Operation

nicht möglich. Es wurde daher einer chemischen Methode zur Molekulargewichtsbestimmung der Vorzug gegeben.

Die chemischen Molekulargewichtsbestimmungsmethoden beruhen auf der Überlegung, daß jedes Polysaccharidmolekül, ob linear oder verzweigt, nur eine reduzierende Endgruppe haben kann. Durch die quantitative Bestimmung dieser reduzierenden Endgruppe können Rückschlüsse auf die Molekülgröße des Polysaccharids gezogen werden. Vor allem zwei Methoden zur chemischen Molekulargewichtsbestimmung haben sich bewährt, die Perjodat-Oxydation (136), die sich auch als ein wertvolles Hilfsmittel zur Feinstrukturermittlung erwiesen hat, und die Oxydation mit 3,5-Dinitrosalicylsäure.

Die Oxydation mit 3,5-Dinitrosalicylsäure wurde zunächst von J.B.SUMNER und V.A.GRAHAM (137) zur Bestimmung von reduzierenden Zuckern verwendet und erstmals von K.H.MEYER, G.NOELTING und P.BERNFELD (111) zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Polysacchariden herangezogen.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte des Hexeneischleimes sowie dessen Fraktionen fand die letztgenannte Methode Verwendung.

Wie F.HOSTETTLER, E.BOREL und H.DEUEL (138) beweisen konnten, wird 3,5-Dinitrosalicylsäure beim Erhitzen mit reduzierenden Zuckern in alkalischer Lösung zu

einem gelborangen Farbstoff, der 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Mit den reduzierenden Endgruppen der Polysaccharide geht die 3,5-Dinitrosalicylsäure unter diesen Reaktionsbedingungen die gleiche Reaktion ein. Das Spektrum einer wäßrig-alkalischen Lösung der 3-Amino-5-nitrosalicylsäure weist zwar bei 458 m μ ein Maximum auf, in den Reaktionslösungen ist das Maximum jedoch durch überschüssiges Reagenz in den Bereich von 480-486 m μ verschoben. Nach den Erfahrungen von F.HOSTETTLER et al. (138) sind jedoch in dem Wellenlängenbereich von 470-520 m μ nur schlecht reproduzierbare Werte zu erzielen, da in diesem Bereich das Reagenz noch absorbiert und dieses aus noch unbekannten Gründen, selbst bei konstanten Reaktionsbedingungen, schwankende Extinktionen aufweist. Gut reproduzierbare Werte werden im stark abfallenden Bereich des Absorptionsspektrums bei 530 m μ gefunden. Aus diesem Grunde wurde auch bei der Bestimmung der Molekulargewichte der Hexeneipolysaccharide mit dieser Methode die Farbintensität der Reaktionslösungen bei dieser Wellenlänge ausgemessen. Als Bezugssubstanz wurde Maltose verwendet. Die Werte zu der Maltose-Eichkurve sind in Tab. 13 zusammengestellt, die Eichkurve ist unter Fig. 23 abgebildet.

Tab. 13

Werte zur Maltose-Eichkurve	
Maltose-Einw. mg	Extinktion
0,4	0,059
0,8	0,22
1,2	0,367
1,6	0,525
2,0	0,666

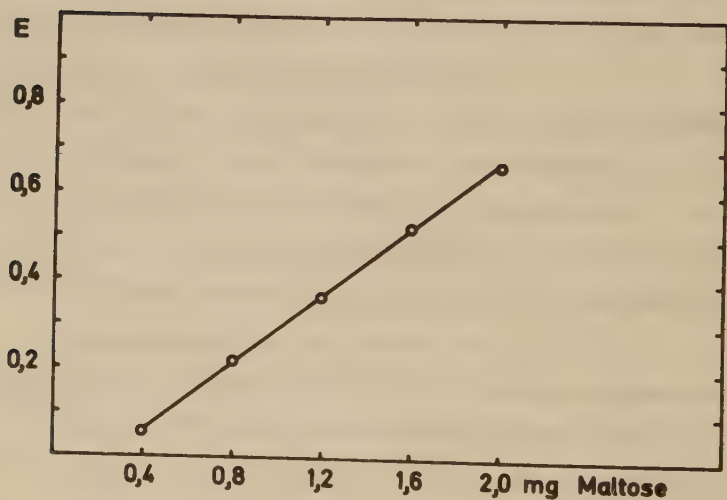


Fig. 23 Maltose-Eichkurve für die Molekulargewichtsbest.

Die nach dieser Methode ermittelten Ergebnisse sind in Tab. 14 angegeben.

Tab. 14

Meßwerte zur Molekulargewichtsbestimmung d. Schleimfraktionen.

Fraktion Nr.	Polysaccharid- einw. in mg	Extinktion
1	20,9	0,352
2	11,2	0,404
3	12,8	0,366
4	17,2	0,4
5	27,9	0,418
6	7,8	0,355
Gesamt- schleim	13,8	0,36

Der Polymerisationsgrad PG wurde auf Grund dieser Meßergebnisse ermittelt, indem Polysaccharidmenge und Maltosemenge gleicher Farbintensität miteinander verglichen wurden. Der Polymerisationsgrad, bezogen auf Glucose, errechnet sich aus

$$PG = 2 \cdot \frac{\text{Einwaage Polysaccharid}}{\text{Einwaage Maltose}}$$

Aus dem Polymerisationsgrad wurde das Molekulargewicht,

bezogen auf Anhydro-Glucose (Mol.Gew. = 162), berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Tab. 15

Zusammenstellung der errechneten PG-Werte und Molekulargewichte der Schleimfraktionen.

Fraktion Nr.	Polymerisationsgrad PG	Molekulargewicht ⁺
1	36	5800
2	17	2700
3	21	3400
4	26	4200
5	41	6600
6	13	2100
Gesamt- schleim	23	3700

⁺) Die Molekulargewichte wurden jeweils auf volle Hundert abgerundet.

Wird aus den Molekulargewichten der einzelnen Fraktionen, unter Berücksichtigung ihres Anteils am Gesamtschleim das mittlere Molekulargewicht berechnet, ergibt sich ein Wert von 4200. Die Übereinstimmung zwischen ermitteltem und errechnetem Molekulargewicht des Gesamtschleimes kann als noch befriedigend angesehen werden.

II. Diskussion

Der Hexeneischleim ist einer der wenigen Pilzschleime, der überwiegend aus Glucuronsäure besteht. Die aus dem Hexeneischleim isolierte Hauptfraktion besteht sogar mit 89 % Glucuronsäure fast ausschließlich aus dieser und ist damit der Alginsäure, als Polymannuronsäure, und der Pektinsäure, als Polygalakturonsäure, vergleichbar.

Die gefundenen Neutralzuckerbausteine im Hexeneischleim entsprechen den in anderen Pilzpolysacchariden gefundenen. Aminosucker dagegen, ein sehr häufiger Baustein von Pilzpolysacchariden war im Hexeneischleim nicht nachweisbar.

Der Hexeneischleim konnte in sechs Fraktionen zerlegt werden, in zwei neutrale und vier saure Fraktionen. In den sauren Fraktionen besteht die Hauptkette des Polysaccharids wahrscheinlich aus Glucuronsäuren, die sich nach einem bestimmten Muster mit Glucose abwechseln. Die anderen nachgewiesenen Zucker scheinen in die Seitenketten eingebaut zu sein.

Die Molekulargewichte der einzelnen Schleimfraktionen liegen zwischen 2100 und 6600. Diese Molekulargewichte sind, in Anbetracht der hohen Viskosität des natürlich

vorkommenden Hexeneischleimes, bei einem Trockengehalt von nur 2 %, sehr niedrig.

Die hohe Viskosität des Schleimes beruht offensichtlich auf dem hohen Uronsäureanteil und der Anwesenheit von mehrwertigen Kationen, wie z.B. Calcium- und Bariumionen, die ja in der Asche des Hexeneischleimes nachgewiesen werden konnten. Ähnlich verhalten sich auch Alginsäurelösungen.

Zuckergele, wie sie mit Pektinen erhalten werden, konnten jedoch mit der Polyglucuronsäure des Hexeneischleimes nicht hergestellt werden.

Um die Struktur der Polysaccharide des Hexeneischleimes annähernd angeben zu können, ist es über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinaus notwendig, die Anordnung der Zuckerbausteine, die Art der Verknüpfung und die Art der Verzweigung kennenzulernen.

III. Zusammenfassung

Es wurde der Schleim aus dem Hexenei, *Phallus impudicus* L. isoliert und gereinigt.

Das Fließverhalten des Hexeneischleimes wurde mit einem Rotationsviskosimeter untersucht; es erwies sich als pseudoplastisch.

Der Hexeneischleim konnte, obwohl er elektrophoretisch einheitlich wanderte, an DEAE-Cellulose in 6 Fraktionen getrennt werden.

Die Untersuchung der Hydrolysate dieser Fraktionen ergab folgende Zusammensetzungen:

- | | |
|-----------|--|
| 1.Frakt.: | Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose,Fucose |
| 2.Frakt.: | Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose |
| 3.Frakt.: | Glucurons., Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose |
| 4.Frakt.: | Glucurons., Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose |
| 5.Frakt.: | Glucurons., Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose |
| 6.Frakt.: | Glucurons., Galaktose,Glucose,Mannose,Xylose |

Die sauren Bestandteile des Gesamtschleimhydrolysates wurden mit Natriumborhydrid reduziert und nochmals hydrolysiert. Der Nachweis von Sorbit und Glucose in

diesem Hydrolysat bewies das Vorkommen von Alduronssäure, bestehend aus Glucuronsäure und Glucose, im sauren Anteil des Schleimhydrolysates.

Die quantitative Bestimmung der neutralen Bausteine der Fraktionen erfolgte papierchromatographisch in Verbindung mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode.

Die Anteile der Glucuronsäure an den Schleimfraktionen wurden titrimetrisch sowie nach der Carbazol-Schwefelsäure-Methode bestimmt.

Die Molekulargewichte des Gesamtschleimes sowie der Schleimfraktionen wurden auf chemischem Wege über die Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Endgruppen mit 3,5-Dinitrosalicylsäure ermittelt.

IV. Experimenteller Teil

1) Gewinnung und Reinigung des Hexeneischleimes

Etwa 100 in der Lüneburger Heide gesammelte und in Aethanol konservierte Hexeneier wurden von ihrer äußeren Hülle befreit und der koagulierte Schleim abgeschabt. Dieser Schleim wurde in Wasser gelöst, zu einer etwa 0,5%igen Lösung verdünnt und 2 Stunden bei 10 000 U/min zentrifugiert. Die klare Schleimlösung wurde vom Sediment abgegossen und lyophilisiert. Die Ausbeute an Rohschleim betrug ca. 20 g. Zur Reinigung wurde jeweils 1 g dieses Rohschleimes in 200 ml Wasser gelöst und über eine Kationenaustauschersäule in der H^+ -Form (ca 100 ml Amberlite IR 120) gegeben. Die Säule wurde mit Wasser nachgewaschen bis die Schleimlösung 500 ml betrug und im Säuleneluat mit Anthron-Reagenz (0,2%ige Lösung von Anthron in Schwefelsäure $D=1,84$) keine Kohlenhydrate mehr nachweisbar waren.

Diese Schleimlösung wurde 72 Stunden gegen 6 x 3 Liter destilliertes Wasser dialysiert. Als Dialysiermembran wurde Visking-Dialysierschlauch (Fa. Serva, Heidelberg) verwendet, der auf Grund seiner großen Porenweite (mittlere Porenweite 24 Å) erheblich kürzere Dialysierzeiten ermöglicht als Cellophanschlauch.

Nach Lyophilisation der so gereinigten Schleimlösung betrug die Ausbeute an Trockenschleim 0,66 g = 66 %.

2) Rheologische Untersuchung des Hexeneischleimes

Es wurde eine 1%ige wäßrige Rohschleimlösung und eine 1%ige Lösung von gereinigtem Gesamtschleim in 0,05 n Natronlauge untersucht. Als Rotationsviskosimeter fand das Rotovisko der Fa. Haake, Berlin, Verwendung. Es wurde mit der Couette-Meßeinrichtung gemessen, als Meßkörper wurden die Typen MV I für den viskosereren Rohschleim und NV für den weniger viskosen Reinschleim eingesetzt. Nach dem Einfüllen in den bei 20° C thermostatierten Meßbecher blieben die Schleime 3 Stunden in Ruhe. Die Messung erfolgte der Reihenfolge nach von den niedrigen zu den hohen Rotationsgeschwindigkeiten, wobei zunächst mit dem Zwischengetriebe ZG 10 gearbeitet wurde, im Anschluß wurde ohne Zwischengetriebe bis zu den höchsten Geschwindigkeiten gemessen. Die Meßzeit bei den einzelnen Rotationsgeschwindigkeiten betrug 30 Sekunden, die Ruhezeit dazwischen ebenfalls 30 Sekunden.

3) Untersuchung des Hexeneischleimes und dessen Fraktionen auf Einheitlichkeit mittels Elektrophorese

Die Untersuchung wurde mit dem Gerät zur Hochspannungselektrophorese nach T. WIELAND und G. PFLEIDERER (59) durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde mit Glasfaser-

papier Nr. 6 der Fa. Schleicher und Schüll, in den Abmessungen 6 cm, 12 cm und 24 cm zu 40 cm gearbeitet. Die verwendeten Puffer- bzw. Elektrolytflüssigkeiten waren 0,1 m Boraxlösung bzw. 2 n Natronlauge. Die Detektion der Polysaccharidflecken erfolgte mit 0,5%iger Kaliumpermanganatlösung in n Natronlauge. Es wurden jeweils 40 µl 1%iger Lösungen der Proben in der jeweiligen Pufferlösung als 2 cm langer Strich auf der Startlinie aufgetragen. Es wurden verschiedene Spannungen und Laufzeiten ausprobiert.

Bei Verwendung von Boraxpuffer konnte bei 6 cm breiten Glasfaserpapierstreifen eine Spannung von 1300 V nicht überschritten werden, da die Kühlung des Gerätes nicht ausreichte und das Papier durchschmolz. Bei breiteren Streifen konnten nur 1000 V angelegt werden, da sonst der zulässige Stromdurchfluß von 90 mA überschritten wurde. Bei der Verwendung von 2 n Natronlauge war aus eben diesem Grund sogar nur eine Arbeitsspannung von 130 V möglich. Die Laufzeit der Elektropherogramme betrug bei Verwendung von Borax-Puffer bis zu 2 Stunden, bei Verwendung von 2 n Natronlauge bis zu 14 Stunden.

4) Fraktionierung des Hexeneischleimes an DEAE-Cellulosesäulen

Auf die Vorbereitung des Säulenmaterials (MN 2100 DEAE von Macherey, Nagel u. Co) ist aus zwei Gründen besondere Sorgfalt zu verwenden:

- a. Es hat sich gezeigt, daß bei der Elution von den Säulen, bei ungenügender Vorbereitung, Cellulosefragmente abgegeben werden, welche bei der Bestimmung der Polysaccharide im Eluat stören.
- b. Handelsübliches DEAE-Cellulosematerial enthält einen Feinanteil. Dieser Feinanteil wirkt sich auf die Durchflußgeschwindigkeit der Säulen sehr nachteilig aus, in ungünstigen Fällen kann es sogar zu Verstopfung der Säulen kommen.

Aus diesen Gründen hat sich folgende Vorbereitung des Säulenmaterials als zweckmäßig erwiesen:

Die DEAE-Cellulose wurde dreimal abwechselungsweise in 0,5 n Salzsäure und 0,5 n Natronlauge aufgeschlämmt und nach dem Sedimentieren der größeren Cellulosepartikel dekantiert. Dabei war es günstig, die Cellulose nach dem Aufschlämmen in einem Vakuumexsikkator zu entlüften, da sonst beim Dekantieren der Verlust an Säulenmaterial zu groß war. Das Sediment wurde jeweils vor der nächsten Behandlung in Wasser aufgeschlämmt, auf einem Büchnertrichter abgesaugt und bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Das Säulenmaterial wurde als dünner

Brei in die Säule auf eine Unterlage aus Glaswolle, Glaskügelchen (1 mm ϕ) und Quarzsand eingefüllt und sedimentieren lassen.

Die DEAE-Cellulosesäule wurde durch Waschen mit 8-10 Säulenvolumina 0,5 M Phosphatpuffer in die Phosphat-Form mit einem pH-Wert 6 gebracht. Der Überschuß an Phosphat wurde mit Wasser ausgewaschen.

Der Schleim wurde bei allen Fraktionierungen als 1%ige Lösung auf die Säule gebracht. Dabei durfte die Trockenschleimmenge ein Hundertstel des eingesetzten Säulenmaterials nicht übersteigen.

Zur Herstellung der analytischen Säulen wurden jeweils 10 g Säulenmaterial verwandt, die Abmessungen betrugen 1,5 cm zu 30 cm. Für die Herstellung der präparativen Säulen wurde jeweils 300 g Säulenmaterial eingesetzt, die Abmessungen dieser Säulen betrugen 5 cm zu 50 cm.

Eluiert wurde mit den im allgemeinen Teil dieser Arbeit angegebenen Lösungsmitteln. Während des Chromatographierens nahm die Säulenhöhe mit steigenden pH-Werten und steigender Elektrolytkonzentration der Elutionsmittel durch Entquellung etwa um die Hälfte ab. Die Durchflußgeschwindigkeit variierte von 40 Tropfen bis 1 Tropfen pro Minute, in Abhängigkeit von der Viskosität des Eluates und der Packungsdichte der Säule.

Die Eluate der analytischen Säulen wurden mit einem automatischen Fraktionensammler in Proben zu 15 ml gesammelt. In diesen wurde der Gehalt an Polysacchariden kolorimetrisch ermittelt:

1 ml Probelösung wurde mit 1 ml 5%iger Phenollösung und 5 ml analytisch reiner Schwefelsäure ($D = 1,84$) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde kräftig geschüttelt, 20 Minuten stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 20°C thermostatiert. Anschließend wurde die Farbintensität in 0,5-cm-Küvetten bei 484 m μ gemessen. Für die Messung wurde ein Zeiss-Spektralphotometer PMQ II verwendet.

Die präparativen Säulen wurden mit jedem Elutionsmittel gespült bis im abtropfenden Eluat keine Kohlenhydrate mehr nachweisbar waren.

Die Fraktionen 1 - 3 wurden jeweils am Rotationsverdampfer im Vakuum bei einer 40°C nicht übersteigenden Temperatur eingeengt und anschließend erst 24 Stunden gegen fließendes Leitungswasser, dann weitere 48 Stunden gegen 4 x 3 Liter destilliertes Wasser dialysiert. Zur Dialyse wurde Visking-Dialysierschlauch (Fa. Serva, Heidelberg) verwendet.

Nach der Dialyse wurden die Fraktionen 1 und 2 sofort lyophilisiert. Die Fraktion 3 wurde, wegen eventuell vorhandener Uronate, erst über einen Kationenaustauscher in der H^{+} -Form (Amberlite IR 120) gegeben und dann lyophilisiert.

Die Fraktionen 4 - 6, die mit Natronlauge eluiert wurden, wurden sofort im Anschluß an die Cellulosesäule über eine Kationenaustauschersäule in der H^+ -Form (Amberlite IR 120) geleitet, um weitgehend einen Abbau des uronsäurehaltigen Materials zu verhindern. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer im Vakuum bei einer $40^{\circ} C$ nicht übersteigenden Temperatur eingeengt, 48 Stunden gegen 4 x 3 Liter destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert.

5) Feststellung der günstigsten Hydrolysedauer

25 mg gereinigter Gesamtschleim wurden mit 5 ml Wasser quellen gelassen und dann durch Zusatz von 5 ml 0,1 n Natronlauge vollständig gelöst. Diese Lösung wurde mit 10 ml 2 n Schwefelsäure versetzt und unter Rückfluß im Ölbad bei $100^{\circ} C$ erhitzt.

Zunächst wurden nach 1,5 und 3 Stunden, im weiteren Verlauf der Hydrolyse alle 3 Stunden, jeweils 2 ml Hydrolysat entnommen.

Die einzelnen Proben wurden mit 1 ml 6 n Natronlauge und mit 1 ml 1,5%iger 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung versetzt. Die Reaktionslösungen wurden 30 Minuten auf $65^{\circ} C$ erhitzt, alsdann, nach Verdünnen mit 10 ml Wasser, 10 Minuten bei $20^{\circ} C$ thermostatiert. Die Farbintensität wurde im Pulfrich-Photometer mit einem

Grünfilter S 53 bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen eine Blindprobe ausgemessen.

In derselben Weise wurde auch für die beiden Neutralfraktionen 1 und 2 die günstigste Hydrolysedauer ermittelt. Die Messungen wurden jedoch im Gegensatz zur Untersuchung des Gesamtschleimes wegen der stärkeren Absorption bei 0,5 cm Schichtdicke durchgeführt.

Zur Durchführung der qualitativen und quantitativen Bausteinanalyse wurden jeweils 50 mg Polysaccharidmaterial mit 5 ml n Schwefelsäure hydrolysiert. Anschließend wurde die Schwefelsäure in den Hydrolysaten durch Ausfällen mit gesättigter Bariumhydroxidlösung bis zu einem pH-Wert von 6 entfernt. Nach Abzentrifugieren des Bariumsulfates wurde das Hydrolysat erst über eine Kationenaustauschersäule in der H^+ -Form (ca. 10 ml Amberlite IR 120) und dann über eine Anionenaustauschersäule in der OH^- -Form (ca. 10 ml Amberlite IR 4B) gegeben. Das Eluat, das die Neutralzucker enthielt, wurde eingeeengt und papierchromatographisch untersucht.

Bei den Hydrolysaten der sauren Fraktionen wurden die sauren Anteile am Anionenaustauscher festgehalten und mußten nach dem Auswaschen der Neutralzucker mit n Schwefelsäure vom Austauscher verdrängt werden. Die Schwefelsäure wurde wiederum durch Fällern mit gesättigter Bariumhydroxidlösung entfernt. Nach dem Einengen unter Vakuum wurden die sauren Bestandteile elektrophoretisch untersucht.

6) Chromatographische Untersuchung der Hydrolysate

Die neutralen Bestandteile wurden papierchromatographisch untersucht, die sauren Bestandteile elektrophoretisch. Für die Papierchromatographie wurde das Papier 2043 b Mgl von Schleicher und Schüll verwendet. Das Laufmittel war n-Butanol:Pyridin:Wasser (10:3:3), das Sprühreagenz Anilinphthalat. Es wurde absteigend in der Durchlauftechnik chromatographiert, die Laufzeit betrug bei allen Versuchen 72 Stunden.

Galactose Laufstrecke = 14,3 cm

Glucose Laufstrecke = 17,4 cm

Mannose Laufstrecke = 21,6 cm

Xylose Laufstrecke = 25,6 cm

Fucose Laufstrecke = 28,1 cm

Für die elektrophoretische Untersuchung der sauren Bestandteile wurde das Papier Nr. 866 von Macherey, Nagel und Co verwandt. Der Puffer (pH 3,5) hatte die Zusammensetzung Pyridin:Eisessig:Wasser (1:9:90). Als Sprühreagenz diente ebenfalls Anilinphthalat. Die Spannung betrug 1150 V, die Wanderungszeit war 3,5 Stunden.

Glucuronsäure Laufstrecke = 15 cm

Galacturonsäure Laufstrecke = 12,5 cm

7) Reduktion der sauren Bestandteile des Gesamtschleim- hydrolysates

Die sauren Bestandteile des Hydrolysates von 250 mg Gesamtschleim wurden, wie beschrieben, isoliert, von Schwefelsäure befreit und zur Trockne eingedampft. Dann wurden diese in Methanol-Wasser (10:1) aufgenommen und bei Zimmertemperatur mit aetherischer Diazomethanlösung in kleinen Anteilen versetzt bis die gelbe Farbe der Diazomethanlösung bestehen blieb. Nach etwa einer Stunde, nachdem die Stickstoffentwicklung aufgehört hatte, wurden der Überschuß an Diazomethan und die Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser aufgenommen und unter kräftigem Rühren in 5 ml einer 4%igen wäßrigen Natriumborhydridlösung langsam eingetropft. Nach 15-stündigem Rühren wurde der Überschuß an Natriumborhydrid durch Ansäuern mit 2 n Schwefelsäure zerstört. Die Lösung wurde mittels Kationen- und Anionenaustauschern in der H^+ - und OH^- -Form (je 10ml Amberlite IR 120 und IR 4B) von anorganischen Bestandteilen befreit und zur Trockene gebracht. Nun wurde mit n Schwefelsäure 3 Stunden hydrolysiert und anschließend die Schwefelsäure in der beschriebenen Weise aus dem Hydrolysat entfernt. Die Identifizierung der Zucker wurde dünnschichtchromatographisch und papierchromatographisch im Vergleich mit authentischem Material vorgenommen.

Dünnschichtchromatographie:

Durch Mischen etwa gleicher Teile 0,1 m Phosphorsäurelösung und 0,1 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung wurde ein Phosphatpuffer von pH 5 (pH-Papier) hergestellt.

Zur Bereitung von 5 Dünnschichtplatten der Größe 20 x 20 cm wurden 20 g Kieselgur G (Fa. Merck, Darmstadt) mit 40 ml der oben angegebenen Phosphatpufferlösung angerührt und ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht an der Luft getrocknet.

Laufmittel war n-Butanol:Aceton:Phosphatpuffer (40:50:10).

Zur Detektion wurde mit 0,1%iger wäßriger Natriummetaperjodatlösung vorgesprüht, dann mit Benzidinlösung.

Die Benzidinlösung wurde bereitet indem 2,8 g Benzidin in 80 ml Aethanol gelöst und dieser Lösung 70 ml Wasser, 30 ml Aceton und 1,5 ml n Salzsäure zugefügt wurden.

Die Laufzeit betrug etwa eine Stunde.

Sorbit Rf-Wert 0,39

Glucose Rf-Wert 0,55

Papierchromatographie:

Es wurde mit dem Papier 2043 b Mgl von Schleicher und Schüll gearbeitet. Das Laufmittel war Methylaethylketon: Eisessig:borsäuregesättigtes Wasser (9:1:1). Es wurde absteigend in der Durchlauftechnik chromatographiert, die Laufzeit betrug 12 Stunden. Als Sprühreagenzien wurden die bei der Dünnschichtchromatographie be-

schriebenen verwendet.

Glucose Laufstrecke 3,2 cm

Sorbit Laufstrecke 11,0 cm

8) Quantitative Bestimmung der Zuckerbausteine

Glucuronsäure:

5 mg der Polysaccharide, genau gewogen, wurden in jeweils 10 ml 0,1 n Natronlauge gelöst und 30 Minuten bei 60° C erhitzt, um die Ester der Glucuronsäure zu verseifen. Anschließend wurde auf 100 ml mit Wasser verdünnt. 2 ml dieser Lösungen, die 100 µg Polysaccharid enthielten, wurden mit 10 ml analysenreiner Schwefelsäure (D=1,84) versetzt, gut durchmischt und 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 10-minütigem Thermostatieren bei 20° C wurde mit 1 ml einer 0,15%igen aethanolischen Carbazollösung versetzt, gut durchmischt und weitere 30 Minuten bei 20° C thermostatiert. Die Farbintensität wurde bei einer Wellenlänge von 520 mµ und einer Schichtdicke von 1 cm gegen eine Blindprobe ausgemessen. Für die Messung wurde ein Zeiss Spektralphotometer PMQ II verwendet. In derselben Weise wurden die Werte zur Glucuronsäure-Eichkurve bestimmt.

Neutralzucker:

Für die quantitative Bestimmung der Neutralzucker wurden jeweils 100 mg Polysaccharidmaterial in 10 ml n Schwefelsäure hydrolysiert und in beschriebener Weise aufgearbeitet. Alsdann wurde jeweils ein Chromatographiepapierbogen (2043 b Mgl, Schleicher und Schüll), von den Abmessungen 35 x 46 cm, in Laufrichtung in sieben jeweils 5 cm breite Streifen unterteilt und die Streifen mit den Buchstaben a-g bezeichnet. Mit einer halbautomatischen 10-ml-Lambda-Pipette wurden an den Startpunkten der Streifen, mit Ausnahme des mittleren Streifens d, der den Blindwert liefern sollte, von einem Hydrolysat aufgetragen. Es wurde 72 Stunden in der Durchlauftechnik mit dem Laufmittel n-Butanol:Pyridin:Wasser (10:3:3) chromatographiert. Danach wurde das Chromatogramm getrocknet, die beiden äußersten Streifen a und g abgeschnitten und die Zuckerflecken auf diesen Leitchromatogrammen mit Anilinphthalat-Sprühareagenz sichtbar gemacht. Mit Hilfe dieser Leitchromatogramme wurden die Zuckerflecken auf dem nicht besprühten Chromatogramm lokalisiert und ausgeschnitten. Die Papierstücke wurden in gleicher Weise zerschnitten u. mit 5 ml Wasser 10 Minuten digeriert. Darauf wurde zur Abtrennung der Papierflusen durch Glasfaserpapier filtriert.

2 ml des Filtrates wurden mit 1 ml 5%iger Phenollösung und 5 ml analysenreiner Schwefelsäure (D=1,84) versetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde kräftig geschüttelt, 20 Minuten stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 20° C thermostatiert. Die Farbintensität wurde in 2-cm-Küvetten im jeweiligen Absorptionsmaximum der Farblösung gegen eine Blindprobe mit einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II ausgemessen. Die Werte zu den Eichkurven der einzelnen Zucker wurden in gleicher Weise bestimmt.

9) Molekulargewichtsbestimmung

10 - 30 mg Polysaccharidmaterial wurden genau eingewogen und dann der Reihenfolge nach 2 ml Wasser, 1 ml 6 n Natronlauge und 1 ml 1,5%ige wäßrige 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 65° C erhitzt, mit 10 ml Wasser verdünnt und 10 Minuten bei 20° C thermostatiert. Die Farbintensität wurde aus den schon im allgemeinen Teil geschilderten Gründen bei 530 mμ ausgemessen, die Schichtdicke betrug 1 cm. Als Meßgerät diente ein Zeiss Spektralphotometer PMQ II. Als Bezugssubstanz für die Molekulargewichtsbestimmung diente Maltose. Die Werte zur Maltose-Eichkurve wurden in gleicher Weise bestimmt.

- 19) H.Venner Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.
338, 189 (1964)
- 20) E.Burcik und Naturwissenschaften 43, 427 (1956)
W.Beutmann
- 21) T.Miyazaki Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 9, 715 (1961)
ref. C.A. 57, 7359 (1962)
- 22) T.Miyazaki Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 9, 826 (1961)
ref. C.A. 57, 7359 (1962)
- 23) T.Miyazaki Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 9, 829 (1961)
ref. C.A. 7359 (1962)
- 24) T.Miyazaki J.pharmac.Soc.Japan 82, 1678 (1962)
ref. C.A. 59, 1735 (1963)
- 25) A.Beatti und Proc.Roy.Soc.Edinburg B 68, Pt 3,
171 (1961)
ref. C.A. 59, 15626 (1963)
E.Percival
- 26) V.P.Bhavanandan, Acta chem.scand. 18(2), 504 (1964)
H.O.Bouveng und
B.Lindberg
- 27) V.A.Aksenova und Biokhim.Plodov i Ovoshchei, Akad.
Nauk SSSR, Inst.Biokhim. 96 (1964)
ref. C.A. 61, 6058 (1964)
B.A.Rubin
- 28) I.R.Siddiqui und Canad.J.Chem. 39, 1683 (1961)
G.A.Adams
- 29) O.N.Savel'ewa und Fisiologija Rassteni 10(2), 189 (1963)
ref. C.A. 59, 6649 (1963)
B.A.Rubin
- 30) Huang-Kai Ho und Formosan Sci. 6, 1 (1951)
ref. C.A. 48, 4770 (1954)
Wei-Hsien Chang
- 31) Huang-Kai Ho und Memb.Coll.Agr., Natl.Taiwan Univ.
2, 1 (1952)
ref. C.A. 49, 1137 (1955)
C.H.Hsiu
- 32) L.Hough und J.chem.Soc. 2801 (1962)
M.B.Perry
- 33) A.Jeanes, Arch.Biochem.Biophysics 92, 343 (1961)
J.E.Pittsley,
P.R.Watson und
R.J.Dimler
- 34) M.E.Slodki Biochim.biophysica Acta (Amsterdam)
57, 525 (1963)

- 35) R.J.Irani und K.Ganapathi J.Sci.Ind.Research 19 C, 207 (1960)
ref. C.A. 55, 5662 (1961)
- 36) H.Deuel und H.Neukom Kolloidchemie makromolekularer
Naturstoffe,Steinkopff Darmstadt 1958
- 37) H.Janecke und W.Kehr Dtsch.Apotheker-Ztg. 102, 398 (1962)
- 38) H.Janecke und W.Kehr Pharmaz.Ztg. 107, 640 (1962)
- 39) P.Andrews und L.Hough Chem.and Ind. 1278 (1956)
- 40) T.Mizuno und T.Kinpyo J.agric.chem.Soc.Japan 29,665 (1955)
- 41) A.N.Martin und G.S.Baker Advances in Pharmaceutical Sciences
Bd.1,S.37, Academic Press
New York 1964
- 42) K.Nisizawa und W.Pigman Biochem.J. 75, 293 (1960)
- 43) M.Geldmacher-Mallinckrodt und H.Weinland Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.292,
65 (1953)
- 44) A.Lehtonen, J.Kärkkäinen und E.Hahti J.Chromatogr. 24, 179 (1966)
- 45) D.R.Briggs, E.F.Garner und F.Smith Nature (London) 178, 154 (1956)
- 46) E.J.Bourne, A.B.Foster und P.M.Grant J.chem.Soc. 4311 (1956)
- 47) K.W.Fuller und D.H.Northcote Biochem.J. 64, 657 (1956)
- 48) B.A.Lewis und F.Smith J.Amer.chem.Soc. 79, 3929 (1957)
- 49) A.B.Foster, P.A.Newton-Hearn und M.Stacey J.chem.Soc. 30 (1956)
- 50) I.A.Preece und R.Hobkirk Chem.and Ind. 257 (1957)

- 51) S.Gardell, Acta chem.scand. 4, 907 (1950)
A.H.Gordon und
S.Åquist
- 52) R.M.Greenway, Research (London) 6, 6S (1953)
P.W.Kent und
M.W.Whitehouse
- 53) C.A.Pasternak Research (London) 5, 486 (1952)
und P.W.Kent
- 54) V.Nantö Acta chem.scand. 17, 857 (1963)
- 55) M.Geldmacher- Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
Mallinckrodt und 307, 179 (1957)
F.May
- 56) D.Hamerman Science 122, 924 (1955)
- 57) C.Rizzoli und Boll.Soc.ital.Biol.sperim.
M.A.Gliozzi 31, 426 (1955)
ref. C.A. 50, 1970 (1956)
- 58) B.C.Bera, A.B.Foster J.chem.Soc. 3788 (1955)
und M.Stacey
- 59) T.Wieland und Angew.Chem. 67, 257 (1955)
G.Pfleiderer
- 60) R.J.Whistler und Methods Carbohydrate Chem. Bd.5,
J.L.Sannella S.34, Academic Press New York 1965
- 61) I.A.Preece und J.Inst.Brew. 58, 353 (1952)
K.G.Mackenzie ref. C.A. 48, 5432 (1954)
- 62) H.Deuel und Makromolekulare Chem. 4, 97 (1949)
H.Neukom
- 63) A.J.Erskine und Canad.J.Chem. 34, 821 (1956)
J.K.N.Jones
- 64) H.Deuel und Makromolekulare Chem. 3, 13 (1949)
H.Neukom
- 65) M.H.Ewart und Analytic.Chem. 24, 1460 (1952)
R.A.Chapman
- 66) H.Meier Acta chem.scand. 12, 144 (1958)
- 67) H.Meier Acta chem.scand. 12, 1911 (1958)
- 68) J.K.Hamilton und Pulp Paper Mag.Canada 59(10), 233
N.S.Thompson (1958)
ref. C.A. 52, 5816 (1958)
- 69) M.O.Gyaw und Canad.J.Chem. 38, 1957 (1960)
T.E.Timell

- 70) T.E.Timell Svensk Papperstidn. 63, 472 (1960)
- 71) T.E.Timell Svensk Papperstidn. 64, 651 (1961)
- 72) H.O.Bouveng und Acta chem.scand. 13, 1884 (1959)
 H.Meier
- 73) I.E.Scott Chem. and Ind. 168 (1955)
- 74) S.A.Barker Chem. and Ind. 330 (1957)
 M.Stacey und
 G.Zweifel
- 75) H.Palmstierna, Acta chem.scand. 11, 1792 (1957)
 I.E.Scott und
 S.Gardell
- 76) H.Meier Acta chem.scand. 16, 2274 (1962)
- 77) G.Bernardi und J.biol.Chemistry 237, 75 (1962)
 G.F.Springer
- 78) D.M.W.Anderson J.chem.Soc. 1 (1963)
 und M.A.Herbich
- 79) G.O.Aspinall und J.chem.Soc. 1702 (1963)
 J.Baillie
- 80) S.A.Olaitan und Biochem.J. 81, 7p (1961)
 D.H.Northcote
- 81) B.J.Hocevar und Nature (London) 179, 488 (1957)
 D.H.Northcote
- 82) B.J.Hocevar Farmac.Vestnik(Ljubljana)
 11, 179 (1960)
- 83) D.H.Northcote Methods Carbohydrate Chem. Bd.5,
 S.51, Academic Press New York 1965
- 84) F.Ulmann Kolloid-Z. 116, 10 (1950)
- 85) F.Ulmann Kolloid-Z. 123, 105 (1951)
- 86) E.H.Fischer und Helv.chim.Acta 36, 811 (1953)
 W.Settele
- 87) A.E.Goodban und J.Amer.Sugar Beet Technol.
 H.S.Owens 9, 129 (1956)
- 88) A.E.Goodban und J.Polymer Sci. 23, 825 (1957)
 H.S.Owens
- 89) S.Gardell Acta chem.scand. 11, 668 (1957)

- 90) C.A.Antonopoulos, Biochim.biophysica Acta(Amsterdam)
E.Borelius, 54, 213 (1961)
S.Gardell,
B.Hamström und
I.E.Scott
- 91) J.Porath und Nature (London) 183, 1657 (1959)
P.Flodin
- 92) J.Porath und Protides of the biological Fluids
P.Flodin 10, 290 (1963)
- 93) K.Granath und Makromolekulare Chem. 48, 160 (1961)
P.Flodin
- 94) K.Kringstad und Papier 18, 583 (1964)
Ö.Ellefson
- 95) K.Steiner, Chimia (Zürich) 12, 150 (1958)
H.Neukom und
H.Deuel
- 96) E.A.Peterson und J.Amer.chem.Soc. 78, 751 (1956)
H.A.Sober
- 97) H.A.Sober, J.Amer.chem.Soc. 78, 756 (1956)
F.J.Gutter,
M.M.Wyckoff und
E.A.Peterson
- 98) H.Neukom, Helv.chim.Acta 43, 64 (1960)
H.Deuel,
W.J.Heri und
E.Kündig
- 99) N.R.Ringertz und Acta chem.scand. 13, 1467 (1959)
P.Reichard
- 100) N.R.Ringertz und Acta chem.scand. 14, 303 (1960)
P.Reichard
- 101) W.Heri, H.Neukom Helv.chim.Acta 44, 1939 (1961)
und H.Deuel
- 102) W.Heri, H.Neukom Helv.chim.Acta 44, 1945 (1961)
und H.Deuel
- 103) G.O.Aspinall und J.chem.Soc. 4215 (1961)
R.S.Fanshawe
- 104) D.M.Anderson und J.chem.Soc. 5333 (1961)
N.J.King
- 105) M.Müller, N.C.Mehta Z.Pflanzenernähr., Düng.,
und H.Deuel Bodenkunde 90, 139 (1960)

- 106) M.Dubois, Analytic.Chem. 28, 350 (1956)
K.A.Gilles,
J.K.Hamilton und
P.A.Rebers
- 107) R.V.Tomlinson J.Amer.chem.Soc. 84, 2644 (1962)
und G.M.Tener
- 108) D.A.Applegarth J.Chromatogr. 15, 246 (1964)
und G.G.Dutton
- 109) G.Jayme und Z.analyt.Chem. 178, 85 (1960)
H.Knolle
- 110) B.Tollens und Ber.dtsch.chem.Ges. 40, 4513 (1907)
K.U.Lefèvre
- 111) K.H.Meyer, Helv.chim.Acta 31, 103 (1948)
G.Noelting und
P.Bernfeld
- 112) A.B.Foster Methods Carbohydrate Chem. Bd.1,
S.51,Academic Press New York 1962
- 113) D.Waldi J.Chromatogr. 18, 417 (1965)
- 114) A.Schweiger J.Chromatogr. 9, 374 (1962)
- 115) E.Chargaff, J.biol.Chemistry 175, 67 (1948)
C.Levine und
C.Green
- 116) S.M.Partridge Nature (London) 164, 444 (1949)
- 117) L.Hough, J.chem.Soc. 1702 (1950)
J.K.N.Jones und
W.H.Wadman
- 118) J.K.Roy Analyst 85, 294 (1960)
- 119) E.Stahl Dünnschicht-Chromatographie S.502,
Springer-Verlag Berlin 1962
- 120) A.Haug und Acta chem.scand. 15, 1395 (1961)
B.Larsen
- 121) W.R.Rees und Nature (London) 181, 767 (1958)
T.E.Reynolds
- 122) R.Dreywood Ind.Engng.Chem.,analyt.Edit.
18, 499 (1946)

- 123) H. Neukom und P. Hui *Chimia (Zürich)* 13, 330 (1959)
- 124) J. R. Helbert und K. D. Brown *Analytic. Chem.* 28, 1098 (1956)
- 125) J. R. Helbert und K. D. Brown *Analytic. Chem.* 33, 1610 (1961)
- 126) R. L. Whistler und M. S. Feather *Methods Carbohydrate Chem.* Bd. 1, S. 467, Academic Press New York 1962
- 127) S. M. Stark jr. *Analytic. Chem.* 22, 1158 (1950)
- 128) E. A. McComb und R. M. McCready *Analytic. Chem.* 24, 1630 (1952)
- 129) E. F. McFarren, K. Brand und H. R. Rutowski *Analytic. Chem.* 23, 1146 (1953)
- 130) K. A. Wallenfels, E. Bernt und G. Limberg *Angew. Chem.* 65, 581 (1953)
- 131) F. G. Fischer und H. Dörfel *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 297, 164 (1954)
- 132) E. Borel, F. Hostettler und H. Neukom *Helv. chim. Acta* 35, 115 (1951)
- 133) T. E. Timell, C. P. J. Glaudemans und A. L. Currie *Analytic. Chem.* 28, 1916 (1956)
- 134) B. G. Chan und J. C. Cain *J. Chromatogr.* 22, 95 (1966)
- 135) J. Immers *J. Chromatogr.* 15, 252 (1964)
- 136) G. W. Hay, B. A. Lewis, F. Smith und A. M. Unrau *Methods Carbohydrate Chem.* Bd. 5, S. 251, Academic Press New York 1965
- 137) J. B. Sumner und V. A. Graham *J. biol. Chemistry* 47, 5 (1921)
- 138) F. Hostettler, E. Borel und H. Deuel *Helv. chim. Acta* 34, 2132 (1951)

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Münster und am Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Marburg auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. H. List.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. H. List, möchte ich an dieser Stelle für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung dieser Arbeit herzlich danken.

Dem Direktor des Institutes für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Marburg, Herrn Prof. Dr. H. Böhme, danke ich für die freundliche Erlaubnis die vielfältigen Einrichtungen und Geräte seines Institutes benutzen zu dürfen.

Lebenslauf

24. 6. 1936 in Chemnitz geboren, als Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Hans Bindler und dessen Ehefrau Else, geborene Augustin
- 1942 - 1943 Volksschule in Chemnitz
- 1943 - 1946 Volksschule in Grebenstein bei Kassel
- 1946 - 1956 Realgymnasium in Hofgeismar
- März 1956 Abitur am Realgymnasium in Hofgeismar
- 1956 - 1958 Apothekerpraktikant in der Erika-Apotheke in Kassel
- März 1958 Pharmazeutische Vorprüfung in Kassel
- 1958 - 1959 Studium der Pharmazie in Graz
- 1959 - 1962 Studium der Pharmazie in Würzburg
- April 1962 Pharmazeutische Prüfung in Würzburg
- Mai 1962 Beginn der Promotionsarbeit am Pharmazeutischen Institut in Münster
- März 1963 Fortsetzung der Promotionsarbeit am Pharmazeutischen Institut in Marburg
- Juli 1967 Abschluß der Promotionsarbeit

Leiter der Promotionsarbeit:
Prof. Dr. P. H. List

